
Induktion antiviraler neutralisierender Antikörper beim Menschen und beim Tier

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft immunogene Konstrukte und ein pharmazeutisches Mittel zur Induktion von humoralen neutralisierenden Immunantworten gegen Virusinfektionen sowie Kits zum Nachweis von Antikörpern und Virusantigenen auf der Basis dieser immunogenen Konstrukte und der induzierten Antikörper. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Induktion einer Antikörperantwort und ein Verfahren zur passiven Immunisierung eines Organismus unter Verwendung neutralisierender Antikörper, die mit den genannten immunogenen Konstrukten gewonnen wurden und einen Bioassay zum Nachweis der Infektion mit Viren.

Die Infektion mit dem menschlichen Immundefizienzvirus HIV (human immune deficiency virus) und das daraus resultierende erworbene menschliche Immundefizienz Syndrom (AIDS: acquired immune deficiency syndrome) hat sich seit seiner Erstbeschreibung in den frühen achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts zu einer der größten globalen Virus-Epidemien entwickelt. Allein im Jahr 2002 infizierten sich weltweit fünf Millionen Menschen mit HIV, davon 800000 Kinder unter 15 Jahren, 3,1 Millionen Menschen starben in Folge der HIV-Infektion und/oder AIDS. Die Anzahl der HIV-Infizierten beläuft sich damit insgesamt auf über 42 Millionen (1). Insgesamt sind heute mehr als 20 Millionen Menschen an HIV/AIDS gestorben. Schätzungen gehen davon aus, dass ohne effektive Gegenmaßnahmen im Jahr 2010 45 Millionen Neuinfektionen zu erwarten sind und im Jahr 2020 etwa 70 Millionen Tote (2).

Im Stand der Technik sind mehrere Therapien von Viruserkrankungen wie HIV-Infektionen bzw. AIDS bekannt. Beschrieben sind beispielsweise Monotherapien mit Hemmern der Reversen Transkriptase wie AZT, Kombinationstherapien, insbesondere mit Reverse-Transkriptase-inhibitoren und Proteaseninhibitoren wie zum Beispiel AZT und Nevirapin oder die Kombinationstherapie von antiretroviralen Substanzen mit Immunmodulatoren und anderen Substanzen wie zum Beispiel Interferon, Interleukinen und/oder Thymostimulin. Diese Therapien ermöglichen es, den physiologischen Zustand des HIV-Infizierten zu stabilisieren. Eine Heilung im klassischen Sinne, das heißt die Eliminierung des Virus, ist jedoch nicht möglich. Aus diesem Grunde gab es

immer wieder Bestrebungen, neue und effektive pharmazeutische Mittel bereitzustellen, die als Prophylaxe bzw. Therapie die humorale bzw. zelluläre Immunantwort in einem infizierten Organismus so aktivieren, dass Viren neutralisiert bzw. abgetötet werden.

- 5 Es ist dem Fachmann bekannt, dass er eine Immunisierung sowohl aktiv als auch passiv herbeiführen kann. Bei der künstlichen aktiven Immunisierung erfolgt eine Applikation definierter Antigene, die zu einer aktiv erworbenen Immunität durch die Bildung von Antikörpern oder zellulärer Immunität führt. Bei der passiven Immunisierung werden die Antikörper oder die Immunzellen direkt appliziert, die zu einer passiv erworbenen Immunität führen. Eine künstliche
- 10 aktive Immunisierung eines Organismus gegen Viren kann beispielsweise durch inaktivierte Viren, virale Proteine oder von Viren abgeleitete Peptide erfolgen, die zum Beispiel neutralisierende Antikörper induzieren. Neutralisierende Antikörper sind für verschiedene Virus-erkrankungen beschrieben worden und können durch die Gabe bestimmter Antigene, insbesondere Virusproteine im Organismus, induziert werden. Eine derartige Aktivierung bzw.
- 15 Induktion einer Immunantwort nennt man Impfen. Dem Fachmann ist dies beispielsweise für Impfstoffe gegen Influenza-Virus, Pockenvirus, Masernvirus und Poliovirus bekannt. Auch gegen porcine endogene Retroviren (PERVs) konnten neutralisierende Antikörper induziert werden (Fiebig et al., 2003), da allerdings kein Tiermodell vorhanden ist, in dem sich PERVs vermehren, konnte die Wirksamkeit dieser Impfstrategie nicht festgestellt werden. Zur Immunisierung wurde
- 20 die vollständige Ectodomäne des transmembranen Hüllproteins dieser Viren appliziert. Auf andere Viren – zum Beispiel HIV – ist diese Immunisierungsstrategie, auch bei Verwendung analoger Hüllproteine oder Bindungsstrukturen, nicht mit Erfolg übertragbar.

- Zunächst ging man bei der Bekämpfung von HIV-Infektionen davon aus, dass durch die Gabe
- 25 von abgeschwächten oder abgetöteten Viren, gegebenenfalls im Zusammenhang mit Zusatzstoffen, eine humorale – beispielsweise über Antikörper bzw. eine zelluläre – beispielsweise über T-Zellen - Immunantwort im Organismus ausgelöst werden kann. Die Versuche zur Induktion einer Immunantwort über die Gabe bzw. die Impfung mit einem abgetöteten oder abgeschwächten Virus bzw. mit Hüllproteinen dieser wurden insbesondere kurz nach Bekanntwerden der Krankheit AIDS stark forciert, da mit dieser Technik bei anderen Virus-Krankheiten gute Resultate erzielbar waren. Es zeigte sich jedoch sehr schnell, dass es mit dieser Methode
- 30 nicht möglich ist, eine gewünschte Antikörperantwort zu induzieren, da die zum Testen verwendeten Viren auf Fremdzellen wuchsen und die Abstoßung dieser Viren auf zellulären Fremdantigenen in der Virushülle beruhte. Insbesondere Ganzvirus-Vakzinen gegen HIV können
- 35 neben zellulären Antigenen auch Strukturen enthalten, die von dem Virus zur Hemmung des

Immunsystems entwickelt wurden, wie immunsuppressive Domänen oder maskierende Kohlenhydrate, wodurch die entwickelten Impfstoffe nicht optimal wirken können.

- 5 Es gibt derzeit keinen Impfstoff, der eine effektive Immunantwort gegen eine HIV-Infektion induzieren kann (3). Generell kann man zwei Strategien zur Induktion einer Immunantwort unterscheiden. Peptid-/Protein-Vakzine, aber auch DNA-Vakzine induzieren eine humorale Immunantwort (4), das heißt die Produktion von Antikörpern zum Schutz vor infektiösen Agenzien. Attenuierte Viren, aber auch DNA- und Lipopeptid-Vakzine bewirken die Produktion von erregerspezifischen Protein-/Peptidsequenzen innerhalb der Wirtszellen, die dann als CTL-
- 10 Epitope im MHC präsentiert werden (3,4), was zu einer zellulären Immunantwort vermittelt durch zytotoxische T-Lymphozyten führt. Bis heute verweisen führende Wissenschaftler darauf, dass nur ein Impfstoff, der in der Lage ist, zytotoxische T-Zellen zu induzieren, für die Prävention einer HIV-Infektion geeignet sei (3).
- 15 Auch wenn die Entwicklung der Suche nach einem Impfstoff in den letzten Jahren in diese Richtung ging, sind im Stand der Technik einige Versuche beschrieben, eine humorale Immunantwort, das heißt eine Antikörperbildung, zu induzieren. Dabei kommt es darauf an, nicht nur sogenannte bindende Antikörper, sondern neutralisierende Antikörper zu induzieren, d.h. Antikörper, die die Infektion verhindern können. Dass prinzipiell neutralisierende Antikörper im Menschen und sogar
- 20 in HIV-Infizierten induziert werden können, zeigt ein im Jahre 1993 beschriebener humaner, monoklonaler Antikörper (2F5), der über eine Zellkultur von einem HIV-positiven Patienten gewonnen werden konnte. Dieser Antikörper besitzt ein Virus-neutralisierendes Spektrum, das nahezu alle Subtypen von HIV umfasst; die Antikörper binden an ein Epitop, das N-terminal des Transmembrandurchganges des transmembranen Hüllproteins gp41 lokalisiert ist. Es konnte
- 25 gezeigt werden, dass die Antikörper mit dem Epitop ELDKWA interagieren. Daher lag es nahe, dieses Epitop in Form eines Peptides bzw. eines modifizierten Peptides - zum Beispiel zyklisiert - in den Organismus zu injizieren, um eine Antikörperantwort gegen das Epitop und demgemäß gegen das Virus auszulösen. So schlugen J. Tian et al. (2002) lineare Nonapeptide vor, die eine hohe Affinität zum Antikörper 2F5 aufweisen. Nach Immunisierung mit unzähligen Formen und
- 30 Modifikationen des ELDKWA-Epitopes wurden jedoch immer nur bindende, aber niemals neutralisierende Antikörper induziert. In der Fachwelt herrscht weitestgehende Einigkeit, dass die Induktion antiviraler neutralisierender Antikörper kein erfolgversprechender Weg einer HIV-Prävention ist.

Weiterhin ist versucht worden, einzelne gp41 Epitope mit anderen Peptiden, zum Teil chemisch miteinander verbunden, zu injizieren, in der Annahme, dass die Anwesenheit weiterer peptidartiger Strukturen zu einer aktiven Bildung neutralisierender Antikörper im Organismus führt. Parker et al. (2001) schlugen beispielsweise vor, die injizierte Domäne des Peptides um die flankierenden Bereiche im natürlichen Zustand dieses Epitopes im gp41 so zu erweitern, dass ein 16-Aminosäurepeptid entsteht, da dieses aufgrund der höheren Komplexität immunogener als das eigentliche Epitop sein sollte. Ho (2002) vermutet, dass das native Epitop mehr eine β -turn-ähnliche als eine helikale Konformation aufweist und dass deshalb das Epitop dem lebenden Organismus als Impfstoff in Form einer β -turn-ähnlichen Konfiguration bereitgestellt werden muss, um aktiv Antikörper zu produzieren. Aber auch derartige Versuche induzierten im lebenden Organismus unter Laborbedingungen immer nur bindende Antikörper, niemals neutralisierende.

Dass derartige neutralisierende Antikörper wie der 2F5-Antikörper nicht nur zur Prävention geeignet sind, sondern auch für eine Therapie, zeigten die Untersuchungen von Ferrantelli et al. (2003), die neutralisierende Antikörper zur passiven Immunisierung verwendeten, wobei die Autoren neben 2F5 weitere Antikörper zur passiven Immunisierung offenbarten, wie zum Beispiel IgG1b12, 2G12 und 4E10. Die V3-Schleife des HIV-Oberflächenproteins gp120 gilt aufgrund ihrer außerordentlichen Immunogenität als erfolgversprechendes Agens, um neutralisierende Antikörper zu induzieren und die neutralisierenden Antikörper 1b12 und 2G12 sind gegen gp120 gerichtet. Andere Oberflächenproteine wie das erwähnte gp41 gelten als wenig erfolgversprechend, da die Fusion mit der Zielzelle über dieses Protein so schnell erfolgt, dass es einem Antikörper nicht möglich ist, schnell genug mit diesem Protein zu interagieren. Neben den für die Therapie einsetzbaren neutralisierenden Antikörpern wurde eine weitere Therapie entwickelt, die gegen gp41 gerichtet ist. Dabei handelt es sich um Peptide, die als sehr kleine Moleküle effektiv mit den für die Infektion verantwortlichen Strukturen von gp41 interagieren können (Weiss et al. 2003). Eines dieser Peptide, T-20, enthält die bereits beschriebene ELDKWA-Sequenz.

Ein wesentlicher Nachteil der dargestellten Vakzinierungsstrategien, vor allem der gegen gp120, besteht darin, dass die eingesetzten Vakzinen nicht in der Lage sind, die Entstehung neuer Virusvarianten bzw. Modifikationen im Laufe der Viruserkrankung zu verhindern (Fluchtmutanten). Die gegen das ursprüngliche Virus gebildeten neutralisierenden Antikörper sind nicht in der Lage, mit dem mutierten Virus so zu interagieren, dass ein erfolgreicher präventiver Schutz oder eine effektive therapeutische Behandlung des infizierten Organismus möglich ist.

Aufgabe der Erfindung war es daher, einen Impfstoff herzustellen, der in Prävention, Diagnose und Therapie von viralen Erkrankungen, insbesondere retroviralen Erkrankungen eingesetzt werden kann.

- 5 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch die Bereitstellung eines immunogenen Konstruktes umfassend Aminosäuresequenzen ausgewählt aus einem viralen transmembranen Hüllprotein, das mindestens über einen Membrandurchgang mit der Virusmembran assoziiert ist, mindestens eine Fusionsdomäne und mindestens zwei alpha-helikale Strukturen umfasst, wobei die Aminosäuresequenzen ausgewählt sind aus
- 10 (i) einem ersten Bereich des Proteins lokalisiert zwischen dem Membrandurchgang und einer ersten alpha-helikalen Struktur sowie
- (ii) aus einem zweiten Bereich, lokalisiert zwischen der Fusionsdomäne und einer zweiten alpha-helikalen Struktur.

Wichtig ist zu vermerken, dass es auf die Kombination beider Bereiche ankommt.

15

Geeignet ist auch ein Konstrukt, das die jeweilige Aminosäuresequenz codierende DNA umfasst, wobei es wiederum auf die Präsenz beider Bereiche in der kodierenden Sequenz ankommt.

- 20 Beansprucht wird also ein immunogenes Konstrukt, welches aus verschiedenen Aminosäuresequenzen besteht. Die beanspruchten Aminosäuresequenzen sind aus einem viralen transmembranen Hüllprotein auszuwählen. Dieses Hüllprotein hat die Voraussetzung zu erfüllen, dass es über mindestens einen Membrandurchgang mit der Virusmembran assoziiert ist und dass es mindestens eine Fusionsdomäne und mindestens zwei alpha-helikale Strukturen
- 25 aufweist. Dem Fachmann ist bekannt, dass mehrere Hüllproteine diese Voraussetzungen erfüllen, wie z. B. GP2, gp20, gp30, gp37, gp160, p15E, HA2, F2 u.a. Jedes dieser genannten Hüllproteine ist ein virales transmembranes Hüllprotein, das mindestens einen Membrandurchgang, eine Fusionsdomäne und zwei alpha-helikale Strukturen aufweist.

- Erfindungsgemäß hat der Fachmann aus den genannten viralen transmembranen Hüllproteinen
- 30 zwei Bereiche von Aminosäuresequenzen auszuwählen. Bei dem ersten Bereich handelt es sich um ein frei auszuwählendes Segment des Hüllproteins zwischen dem Membrandurchgang dieses Hüllproteins sowie der ersten alpha-helikalen Struktur, die dieses Hüllprotein aufweist. Bei dem zweiten Bereich, der aus dem genannten Hüllprotein auszuwählen ist, handelt es sich um den

Abschnitt, der zwischen der Fusionsdomäne des transmembralen Hüllproteins liegt und der zweiten alpha-helikalen Struktur dieses Hüllproteins, wobei die alpha-helikale Struktur, der Membrandurchgang und/oder die Fusionsdomäne ein Teil des immunogenen Konstruktes sein können. Die Kombination beider Bereiche führt zur Induktion der neutralisierenden Antikörper.

5 Von allen genannten und beanspruchten Hüllproteinen liegen bereits Sekundär- und Tertiärstruktur-Untersuchungen vor, so dass der Fachmann die genannten Bereiche, aus denen die Aminosäuresequenzen auszuwählen sind, genau bestimmen kann. Er ist hierbei nicht auf bestimmte Bereiche beschränkt. Erfindungswesentlich ist, dass das immunogene Konstrukt zwei Aminosäuresequenzen umfasst, wobei diese beiden Aminosäuresequenzen aus ganz

10 bestimmten Bereichen von viralen transmembranen Hüllproteinen auszuwählen sind.

Überraschend wurde gefunden, dass ein immunogenes Konstrukt, welches mindestens zwei Aminosäuresequenzen umfasst, in einem Organismus neutralisierende Antikörper induzieren kann und so gegebenenfalls zusammen mit dem Fachmann bekannten Hilfsstoffen als Vakzine

15 eingesetzt werden kann. Ein immunogenes Konstrukt im Sinne der Erfindung ist jedes Mittel, das geeignet ist, neutralisierende Antikörper, zu induzieren. Durch eine solche Antikörperantwort werden Antikörper im Organismus bereitgestellt, die eine neutralisierende Wirkung auf das jeweilige Retrovirus oder ein anderes Viren haben. Unter Berücksichtigung der Komplexität der beteiligten Mechanismen wird unter der Neutralisation eines Virus jeder Mechanismus ver-

20 standen, der in vivo bzw. in vitro Viren an der Infektion hindert und ihre Vermehrung im präventiven Sinne verhindert beziehungsweise im therapeutischen Sinne die weitere Vermehrung der Viren hemmt oder eine Kombinationstherapie effektiver werden lässt. Das heißt, durch das erfindungsgemäße Konstrukt wird das Immunsystem aktiviert und die Bildung neutralisierender Antikörper induziert. Vorteilhafterweise sind die neutralisierenden Antikörper insbesondere gegen

25 die viralen Strukturen gerichtet, durch die sie induziert wurden, wobei kreuzreagierende Antikörper erfindungsgemäß nicht ausgeschlossen sind.

Bei der Infektion mit umhüllten Viren einschließlich der Retroviren einschließlich HIV finden Interaktionen zwischen den Oberflächenhüllproteinen und zellulären Rezeptoren statt, die dann

30 zu Konformationsveränderungen im transmembranen Hüllprotein führen und zur Fusion mit der Zellmembran (Abb.1, Abb.2). Die transmembranen Hüllproteinen enthalten hochkonservierte Domänen, die eine wichtige Rolle beim Infektionsprozess spielen und deshalb exzellente Targets für die Induktion breit neutralisierender Antikörper darstellen.

Es ist im Sinne der Erfindung beispielsweise möglich, das mit der Membran assoziierte virale Protein bzw. transmembrane Hüllprotein direkt aus einem Virus für die weitere Verwendung zu gewinnen. Hierbei kann es sich beispielsweise insbesondere um das virale Hüllprotein gp41 von HIV handeln. Hüllproteine besitzen unter anderem einen Bestandteil, der in der Membran verankert ist und einen Bestandteil, der zumindest teil- und zeitweise nach außen aus der Membran herausragt. Erfindungsgemäß stammen die ausgewählten Aminosäuresequenzen bevorzugt aus dem aus der Membran herausragenden Teil. Dieses transmembrane Hüllprotein umfasst eine Ectodomäne, einen Anker und einen zytoplasmatischen Teil, wobei die Ectodomäne eine Fusionsdomäne, eine erste alpha-helikale Struktur, einen Cystein-loop und eine zweite alpha-helikale Struktur aufweist. C-terminal folgt nach der zweiten alpha-helikalen Struktur eine Ankerdomäne, die das transmembrane Hüllprotein gp41 in der Virusmembran verankert. Die ausgewählten Aminosäuresequenzen, die z.B. Domäne, Peptide oder rekombinante Proteine oder Fragmente hiervon sein können, können auf verschiedene Weise durch den Fachmann gewonnen werden, bevorzugt durch Peptidsynthese oder gentechnische Herstellungen. Selbstverständlich ist auch möglich nicht die Aminosäuresequenzen zu verwenden, sondern die sie codierende DNA. Beispielsweise kann die DNA in einen Vektor verpackt werden. In den Zellen wird dann die entsprechende Aminosäuresequenz codiert. Derartige Verfahren sind dem Fachmann aus der Gentherapie bekannt.

Erfindungsgemäß wird beispielsweise bei gp41 von HIV N-terminal ein Bereich, der auch als Peptidabschnitt bezeichnet werden kann, zwischen der Fusionsdomäne und der ersten alpha-helikalen Struktur ausgewählt. Ein zweites Peptid wird aus dem Bereich zwischen der Membran und einer dieser zugewandten alpha-helikalen Struktur ausgewählt. Im Sinne der Erfindung heißt zwischen zwei Bereiche auswählen, dass die flankierenden Bereiche wie z. B. Membrandurchgang, alpha-helikalen Struktur und/oder Fusionsdomäne zumindest teilweise Bestandteile des ausgewählten Abschnitts sein können. Es ist wichtig, dass die Aminosäuresequenzen, die im Sinne der Erfindung zwischen dem Membrandurchgang und einer alpha-helikalen Struktur und zwischen der Fusionsdomäne und der anderen alpha-helikalen Struktur ausgewählt wurden, nur in Kombination verwendet werden und Bereiche des Membrandurchgangs, der Fusionsdomäne und/oder der alpha-helikalen Struktur oder Strukturen teilweise oder vollständig umfassen können.

Der Begriff der der Membran zugewandten alpha-helikalen Struktur beschreibt nicht die Ausrichtung dieser alpha-helikalen Struktur, sondern lediglich das Verhältnis der mindestens zwei alpha-helikalen Strukturen zur Membran; die der Membran zugewandte alpha-helikale Struktur

besitzt eine geringere räumliche Distanz zur Membran, sofern das Hüllprotein als lineare nicht gefaltete Struktur dargestellt oder angenommen wird. Demgemäß liegt die zugewandte Struktur räumlich näher am Membrandurchgang des linear gedachten Hüllproteins. Selbstverständlich ist es möglich, dass durch natürliche oder artifizielle Faltungsvorgänge die Position einzelner Bestandteile des Hüllproteins geändert wird.

Die aus dem Hüllprotein ausgewählten Aminosäuresequenzen, z.B. Peptide oder Proteindomänen, die den Bereichen in der Nähe der alpha-helikalen Strukturen entsprechen, können aus dem Gesamtprotein entnommen werden bzw. nachdem ihre natürliche Sequenz-
10 abfolge bekannt ist, synthetisch bzw. gentechnisch gewonnen werden. Die so erhaltenen Peptide, rekombinante oder virale Proteine werden als immunogenes Konstrukt verwendet, indem sie in einen Organismus appliziert werden. Die Größe der ausgewählten Aminosäuresequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche, indem er z.B. die Antikörper-
15 produktion oder -antwort misst, bestimmen.

Erfindungswesentlich ist, dass aus dem Bereich einer Ectodomäne eines insbesondere transmembranen Hüllproteins eines Virus zwei Aminosäuresequenzen ausgewählt werden, wobei die erste Aminosäuresequenz aus dem Bereich zwischen Fusionsdomäne und einer hieran flankierenden oder räumlich versetzten folgenden alpha-helikalen Struktur und die zweite
20 Aminosäuresequenz aus dem Bereich zwischen der Membran des Virus und der nächsten alpha-helikalen Struktur ausgewählt wird. Nach diesen Aminosäuresequenzen werden synthetische Peptide, rekombinante Proteine hergestellt bzw. eine DNA, die diese Aminosäuresequenzen codiert. Die Auswahl kann hierbei so erfolgen, dass die Aminosäuresequenzen noch Bereiche der alpha-helikalen Struktur bzw. der Ankerstruktur, die
25 das Hüllprotein mit der Membran verankert, umfassen.

Selbstverständlich können neben dem HIV auch aus allen anderen umhüllten Viren einschließlich der Retroviren erfindungsgemäße immunogene Konstrukte gewonnen werden, weiterhin bevorzugt sind: FeLV, MuLV, BIV, CAEV, EIAV1, FIV, OMVV, SIVmac, SIVcpz, VILV, RSV, ALV,
30 JSRV, SMRV, SRV, GALV, BLV, HTLV-1, HTLV-2, Marburg Virus, Ebola, SARS-Virus, Influenza-Virus, Masernvirus, Mumpsvirus und/oder HPV-1. Alle so gewonnenen Aminosäuresequenzen, Peptide oder rekombinante Proteine oder virale Proteine können als immunogenes Konstrukt verwendet werden, um neutralisierende Antikörper gegen diese Viren zu generieren, wobei erfindungsgemäß nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu Kreuzreaktivitäten kommt, so dass
35 beispielsweise ein immunogenes Konstrukt, welches zum Beispiel aus MuLV oder vollständig

artifizuell gewonnen wird, auch eine Wirkung gegen zum Beispiel HIV oder FeLV zeigen kann. Bevorzugt ist es jedoch, dass die durch das immunogene Konstrukt induzierten neutralisierenden Antikörper gegen die Viren gerichtet sind, aus denen die jeweiligen Peptide gewonnen werden. Die immunogenen Konstrukte können auch rekombinante Proteine sein, die aus Teilen
5 des transmembranen Hüllproteins eines Virus und den zwei erfindungsgemäßen Domänen eines anderen Virus bestehen, sogenannte Hybride. Des Weiteren wird für die Immunisierung auch DNA verwandt, die diesen Peptiden oder rekombinanten Proteinen dieser Viren entspricht. Auch eine Kombination zwischen DNA-Immunisierung und nachfolgender Immunisierung mit Peptiden oder rekombinanten Proteinen oder in Mehrfachabfolge ist bevorzugt. Die neutralisierende
10 Wirkung der Antikörper auf umhüllte Viren einschliesslich der Retroviren in Hinsicht auf ihr prophylaktisches Potential zeigt sich zum Beispiel als Inhibition der Virusinfektion, als Inhibition der Syncytiumbildung, als Inhibition der Fusion zwischen Virus und Targetmembran, als Verminderung oder Stabilisierung der Vermehrungsrate der Viren in einem Organismus oder anders. Die neutralisierende Wirkung in Hinsicht auf ihre therapeutische Wirkung kann
15 beispielsweise darin bestehen, dass durch die Induktion oder Applikation der Antikörper beispielsweise als erwünschter Nebeneffekt bestimmte antivirale Medikamente besser wirken oder durch Verminderung der Dosis die Anzahl der Nebenwirkungen dieser Medikamente reduziert wird. Das heißt, die Wirkung der Antikörper im Sinne der Erfindung ist nicht auf eine Eliminierung der Viren beschränkt, sondern umfasst das gesamte Spektrum vorteilhafter Wir-
20 kungen in einer Therapie bzw. Prophylaxe.

Die mindestens zwei Peptide oder rekombinanten Proteine oder deren entsprechende DNA können für sich allein oder in Kombination gegebenenfalls mit anderen Antigenen, die von Interesse sind, verwendet werden. Beispielsweise können sie mit anderen Antigenen als
25 physikalische Mischungen oder miteinander chemisch gebunden mit oder ohne Spacermolekül verwendet werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die beiden erfindungsgemäßen Peptide oder rekombinanten Proteine miteinander chemisch oder physikalisch verbunden werden. Es ist auch möglich, die Peptide mit Trägerpeptiden, Proteinen oder Trägersubstanzen zu koppeln. Hierbei kann es sich beispielsweise um Albumine, das KLH, das MAP und andere
30 Proteine handeln, die dem Fachmann für ihr immunogenes Vermögen bekannt sind; als Trägersubstanzen sind weiterhin bevorzugt Thyroglobulin oder BSA. Diese Proteine können durch Nicht-Peptidbindungen gebunden werden, wie zum Beispiel über eine Disulfidbrücke oder Bindungen durch Kalzium-Ionen, aber es ist ebenso möglich, dass sie über eine Peptidbindung miteinander verbunden werden. Die Peptide können selbstverständlich Substitutions-, Deletions-
35 und Additionsanaloge der erfindungsgemäßen Peptide sein.

Erfindungsgemäß kann es sich bei den Viren um sämtliche Viren handeln, die eine Membran aufweisen, mit der Hüllproteine bzw. ähnliche Strukturen assoziiert sind, wobei diese Strukturen zumindest eine Ectodomäne aufweisen müssen, die eine Fusionsdomäne und/oder eine alpha-helikale Struktur enthält. Bei der Membran der Viren kann es sich um jede Struktur, die Lipide umfasst, handeln, sofern diese es ermöglicht, mit Proteinen eine Verbindung einzugehen.

Das Einbringen des immunogenen Konstruktes in einen Organismus kann erfindungsgemäß auf jede Art und Weise geschehen, die es ermöglicht, dass das Immunsystem so mit dem Konstrukt in Kontakt gebracht wird, dass eine Antikörperantwort induziert wird. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass das immunogene Konstrukt oral oder rektal, enteral bzw. parenteral, aufgenommen wird oder in den Körper direkt – zum Beispiel in ausgewählte Organe wie zum Beispiel die Milz oder in Blutgefäße - injiziert wird. Bevorzugt ist weiterhin die Schluckimpfung oder die Impfung durch Injektion. Bevorzugte Injektionen sind die intradermale, subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektion. Selbstverständlich ist es auch möglich, das immunogene Konstrukt als Aerosol bereitzustellen, welches von dem Organismus, bevorzugt einem humanen Patienten, inhaliert wird. So ist zum Beispiel in der DE 198 51 282 A1 ein Verfahren zum Aufbringen von Antigenen auf Schleimhäute beschrieben, welches in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Erfindung mit aufgenommen ist. Weitere Applikationen werden im Folgenden im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren dargestellt. Die Applikation der für die Immunisierung verwendeten DNA geschieht z.B. mit Hilfe sogenannter Impfpistolen, die die DNA mittels Goldkugeln in die Haut einbringen oder mittels Spritzen, die die DNA unter die Haut oder in den Muskel einbringen können.

Es wurde überraschend gefunden, dass das Zusammenwirken von mindestens zwei Aminosäuresequenzen, z.B. zwei Peptiden oder rekombinanten Proteinen - die Teile von definierten Domänen sind und zwischen anderen definierten Domänen positioniert sind - aus einem Hüllprotein eines Virus als einfaches und effektiv bereitzustellendes Immunogen verwendet werden können. Durch das Zusammenwirken der beiden Peptide oder rekombinanten Proteine bzw. der entsprechenden DNA wird zumindest ein Epitop dem Immunsystem so effektiv präsentiert, dass neutralisierende Antikörper gegen Viren generiert werden.

Das erfindungsgemäße Konstrukt ist in dem Sinne artifiziell, dass es kein natürlicher Weise vorkommendes vollständiges Hüllprotein darstellt, d. h. die natürlichen vollständigen Hüllproteine sind nicht durch die erfindungsgemäße Lehre umfasst. Bei der Verwendung als Vakzin können

natürlich vorkommende transmembrane Hüllproteine, isoliert aus dem Virus, oder entsprechende lösliche Ektodomänen der transmembranen Hüllproteine (außer HIV) eingesetzt werden. Im einfachsten Fall besteht das Konstrukt aus zwei Aminosäuresequenzen, die nicht chemisch oder anders miteinander verbunden sind. Es kann jedoch vorteilhaft sein, wenn die

5 Aminosäuresequenzen direkt oder über einen Linker oder einen Träger miteinander assoziiert vorliegen. Weiterhin ist es bevorzugt, dass die ausgewählten Aminosäuresequenzen aus einem Hüllproteinen in ein anderes virales Hüllprotein oder Fragmente hiervon durch Addition oder Substitution oder andere, dem Fachmann bekannte Methoden eingebracht werden. Demgemäß kann der Träger der ausgewählten Aminosäuresequenzen eines Virus das transmembrane

10 Hüllprotein eines anderen Virus sein.

Um die protektive oder therapeutische Wirkung der erfindungsgemäßen Peptide oder rekombinanten Proteine, das heißt im Wesentlichen die Induktion von neutralisierenden Antikörpern zu erhöhen, können dem immunogenen Konstrukt bzw. allen Mitteln, die aus diesem

15 hergestellt werden können, insbesondere dem Impfstoff, der Vakzine, Adjuvantien zugesetzt werden. Bekannte Adjuvantien für Humanvakzinen sind zum Beispiel Aluminiumverbindungen wie Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat. Aluminiumhydroxid ist Bestandteil zahlreicher inaktiverter oder Subunit-Vakzinen unter anderem bei Hepatitis-B-Virusimpfstoffen und daher dem Fachmann gut bekannt. Weitere bekannte Adjuvantien sind beispielsweise MF 59 im Flud.

20 Im Sinne der Erfindung ist aber jede Substanz, die bei gleichzeitiger, zeitnaher oder zeitversetzter Verabreichung mit den erfindungsgemäßen Peptiden oder Proteinen eine spezifische Immunantwort gegen diese ermöglicht, verstärkt oder modifiziert ein Adjuvanz im Sinne der Erfindung. So kann beispielsweise die Coapplikation von Ei-Albumin in komplettem Freund'schen Adjuvanz unter Umständen eine gesteigerte Ausbildung einer zellvermittelten Immunität hervor-

25 rufen und somit die Wirkung neutralisierender Antikörper unterstützen. Weitere Adjuvantien von Interesse sind zum Beispiel Saponine, wie zum Beispiel QS 21, Muramyl-dipeptid, Muramyl-tripeptid und Verbindungen mit einem Muramylpeptidkern, Proteine wie zum Beispiel Gamma-interferon und TNF oder Phosphatidylcholin, Squalen bzw. die dem Fachmann bekannten Polyole. Dasselbe trifft für die für die Immunisierung verwendete DNA zu. Auch hier

30 können DNA, die selbst eine immunstimulatorische Eigenschaft haben, oder ein Protein mit Adjuvanzeffekt darunter auch Zytokine kodieren, parallel oder in einem Konstrukt appliziert werden.

Die immunogenen Konstrukte, die entweder als rekombinantes Protein oder als synthetisches

35 Peptid mit obengenannten Modifikationen vorliegen, können auch in Kombination mit anderen

Impfstoffen, darunter auch kommerziell bereits vertriebenen Impfstoffen angewendet werden können, ungeachtet dessen, ob der andere Impfstoff gegen dasselbe Virus gerichtet ist oder gegen andere Viren (Kombinationsimpfung).

Im Folgenden sollen einige Begriffe im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Lehre
5 erläutert und definiert werden:

Der Begriff Antigen bezeichnet wie hierin verwendet eine Verbindung, die ein oder mehrere Domänen enthält, gegen die eine Immunantwort erwünscht sind. Die Bindungsorte der Antikörper in diesen Domänen werden Epitope genannt. Komplexe Mischungen von Antigenen sind in
10 dieser Definition ebenfalls umfasst, wie zum Beispiel abgetötete Zellen, Bakterien oder Viren bzw. Fraktionen hiervon, jeweils in Verbindung mit den erfindungsgemäßen Peptiden, rekombinanten Proteinen oder der zur Immunisierung verwendeten DNA.

Der Begriff Beimischen bezeichnet wie hierin verwendet den Zusatz eines Exzepienten zu den
15 erfindungsgemäßen Peptiden, rekombinanten Proteinen, komplexen Mischungen und/oder Adjuvant von Interesse wie zum Beispiel durch Mischung von trockenen Reagenzien oder Mischung eines trockenen Reagens mit einem Reagens in Lösung oder Suspension, oder Mischungen wässriger Formulierungen von Reagenzien.

Der Begriff Exzipient bezeichnet wie hierin verwendet einen einer pharmazeutischen
20 Zusammensetzung zugesetzten, nicht therapeutischen Träger, der pharmazeutisch annehmbar, das heißt für Rezipienten bei angewendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch ist. Geeignete Exzipienten und ihre Formulierungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise aus Remington's pharmaceutical science, 16. Auflage, 1980.

25 Vakzine bezieht sich wie hierin verwendet auf eine Formulierung der erfindungsgemäßen Peptide oder rekombinanten Proteine oder der zur Immunisierung verwendbaren DNA, gegebenenfalls in Kombination mit einem anderen Antigen oder einer anderen DNA, von der beabsichtigt ist, eine prophylaktische, therapeutische oder diagnostische Reaktion in oder außerhalb eines Wirts
30 bereitzustellen, wenn der Wirt den Antigenen ausgesetzt wird. Beispielhafte Vakzinen umfassen Vakzinen gegen Krankheiten wie HIV/AIDS, SARS, FeLV und andere.

Der Ausdruck therapeutische Menge bezeichnet wie hierin verwendet eine Menge, die Symptome einer Störung oder responsiven, pathologisch physiologischen Kondition verhindert oder
35 verbessert. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist die verabreichte

Menge ausreichend, eine Immunantwort auszulösen, die im Wesentlichen die Infektion oder Ausbreitung eines infektiösen Agens - wie SARS, HIV oder FeLV - im Rezipienten verhindert oder hemmt.

- 5 Die einen Gesunden im Falle der Prophylaxe bzw. an einen Patienten im Falle der Therapie zu verwendende Menge an immunogenem Konstrukt wird formuliert und die Dosis gemäß üblicher medizinischer Praxis festgesetzt, wobei die zu behandelnde Störung, der Zustand des einzelnen Patienten, die Verabreichungsstelle, das Verabreichungsverfahren und andere, den behandelnden Ärzten bekannte Faktoren berücksichtigt werden. In ähnlicher Weise hängt die
- 10 Dosis der verabreichten Vakzinen von den Eigenschaften des verwendeten Antigens ab, das von dem Immunogen, beispielsweise von dessen Bindungsaktivität und in vivo Halbwertszeit im Plasma wie auch von der Konzentration des Antigens in der Formulierung, dem Verabreichungsweg, der Stelle und der Rate der Dosierung, der klinischen Toleranz des jeweiligen Individuums (Mensch und Tier), der pathologischen Affektion des Patienten und
- 15 dergleichen, wie es Ärzten bzw. anderen Fachleuten bekannt ist. Im Allgemeinen werden Dosierungen von etwa 0,1 bis 1000 mg pro Individuum und Verabreichung bevorzugt. Es können während einer Abfolge aufeinander folgender Impfungen auch unterschiedliche Dosierungen eingesetzt werden; der behandelnde Arzt kann eine erste Impfung verabreichen und dann mit relativ geringen Dosen an Adjuvantien auffrischen (boosten); hier sind die Möglichkeiten Protein-Protein,
- 20 Peptid-Peptid, Protein-Peptid oder umgekehrt, DNA-Protein/Peptid bevorzugt. Es wird weiterhin auf die folgenden Ausführungen zum erfindungsgemäßen Verfahren verwiesen.

- Es ist zum Beispiel vorgesehen, dass Injektionen (intramuskulär oder subkutan oder in die Blutgefäße) ein bevorzugter Weg für die therapeutische Verabreichung der Vakzinen,
- 25 beispielsweise der eingekapselten oder an Träger gebundenen Vakzinen, sind, obgleich die Zufuhr als Aerosol, über Katheter oder chirurgische Schläuche auch angewendet werden kann. Alternative Wege umfassen Suspensionen, Tabletten, Kapseln und dergleichen für die orale Verabreichung, im Handel erhältliche Vernebler für flüssige Formulierungen und Inhalationen von lyophilisierten oder aerolysierten Verbindungen und Suppositorien für rektale oder vaginale
- 30 Verabreichung. Flüssige Formulierungen können beispielsweise aus Pulverformulierungen angewendet werden. Für die prophylaktische Immunisierung sind Injektionen der Proteine, Peptide und DNA vorgesehen. Die Eignung der gewählten Impfparameter, zum Beispiel Dosis, Schema, Adjuvanzwahl und dergleichen kann durch Entnahme von Serum-Aliquoten aus dem Patienten - das heißt dem Mensch oder dem Tier - und Testen auf Antikörpertiter im Verlauf des
- 35 Immunisierungsprotokolls bestimmt werden. Alternativ und begleitend dazu kann die Menge von

T-Zellen oder anderen Zellen des Immunsystems auf herkömmliche Weise bestimmt werden, um einen Gesamtüberblick über die immunologische Konstitution des Patienten zu erhalten. Zusätzlich kann der klinische Zustand des Patienten auf die gewünschte Wirkung, zum Beispiel die antiinfektiöse Wirkung hin beobachtet werden. Da beispielsweise HIV oder andere Erkrankungen mit weiteren Infektionen assoziiert sein können, ist es auch möglich, diese zusätzlich mit zu verfolgen. Wenn unzureichende Immunisierung erzielt wird, dann kann der Patient mit weiteren Impfungen geboostet und die Impfparameter in einer Weise modifiziert werden, von der eine Verbesserung der Immunantwort erwartet werden kann, bevorzugt eine Erhöhung der Peptid- oder Antigen- und/oder Adjuvanzmenge, Komplexierung der Peptide mit einem Träger oder dessen Konjugation an ein immunogenes Protein oder Variierung des Verabreichungsweges.

Im Allgemeinen können sowohl wässrige Formulierung als auch trockene Peptide oder Adjuvantien mit einem Exzipienten vermengt werden, um für eine stabilisierende Wirkung vor der Behandlung beispielsweise mit einem Lösungsmittel zu sorgen. Eine wässrige Lösung eines Peptides kann ein Peptid in Suspension oder eine Lösung sein.

Das erfindungsgemäße rekombinante Protein, das DNA-Konstrukt und/oder das Peptid können in einer Lösung mit einem Konservierungsmittel eingebracht sein. Beispiele für geeignete Konservierungsmittel der Suspension bzw. Lösungen umfassen Phenol, Benzylalkohol, m-Kresol, Methylparaben, Propylparaben, Benzalkoniumchlorid und Benzethoniumchlorid. Im Allgemeinen können die Formulierungen der Peptide bzw. der Antigenkonstrukte Komponente in Mengen enthalten, die der Herstellung stabiler Formen nicht abträglich sind und Mengen, die für wirksame, sichere pharmazeutische Verabreichungen geeignet sind. Beispielsweise können andere pharmazeutisch annehmbare, dem Fachkundigen bekannte Exzipienten einen Teil der erfindungsgemäßen Vakzinen oder Formulierungen bilden. Diese umfassen beispielsweise Salze, verschiedene Füller, zusätzliche Pufferagenzien, Chelatbildner, Antioxydanzien, Co-Lösungsmittel und dergleichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das immunogene Konstrukt mit einer liposomalen Formulierung assoziiert. Dies kann beispielsweise so erfolgen, dass das immunogene Konstrukt in einem Liposom eingeschlossen oder auf der Liposomenoberfläche verankert vorliegt. Dem Fachmann ist bekannt, dass künstliche bzw. natürliche Membranen von Liposomen eine immunstimulierende Wirkung haben können, insbesondere dann, wenn die antigenen Komponenten auf die Oberfläche der Liposomen gekoppelt werden oder im Inneren

der Liposomen eingeschlossen sind oder einfach nur mit den Liposomen zusammen vermischt werden. Bevorzugt ist, dass die immunstimulierende Wirkung erhöht wird, indem die Liposomen mit transmembranen oder fusiogenen Glycoproteinen "gespiked" sind. Derartige Formulierungen von Liposomen können parentral appliziert werden. Es ist möglich, derartige Formulierungen mit
5 bekannten Methoden, wie zum Beispiel einem Spray, nasal auf die Schleimhäute der Nasenhöhlen zu applizieren. Eine mit dem Spray induzierbare mukosale Immunantwort ist bevorzugt für die Behandlung von SARS geeignet. Insbesondere bei der nasalen Verabreichung muss die antigene Komponente bzw. das immunogene Konstrukt in einem solchen Zustand auf die Schleimhaut aufgetragen werden, dass es in der Lage ist, die Schleimhaut zu durchdringen oder
10 durch diese absorbiert zu werden. Daher muss das Vesikel mit dem Schleim biokompatibel sein und ein gewisses Maß an Hydrophilie aufweisen. Dem Fachmann sind derartige Strukturen beispielsweise aus der EP 0682528 bekannt, deren Lehre mit in den Offenbarungsgehalt der Erfindung aufgenommen ist. Die liposomale Zusammensetzung kann einen oder mehrere zusätzliche pharmazeutische Träger umfassen, die ausgewählt sind aus oberflächenaktiven Stoffen und Absorptionsförderern wie zum Beispiel Polyoxyethylenalkoholethern, Gallensalzen und deren Derivaten, Fusidinsäure und deren Derivaten, Oleinsäure, Lecithin, Lysolecithinen, Tween® 21 bis 85, usw., wasserabsorbierenden Polymeren wie zum Beispiel Glycofurool, Polyethylenglycol 200 bis 7500, Polyvinylpyrrolidon, Propylenglycol oder Polyacrylsäure, Gelatine, Cellulose und Derivaten usw.; Substanzen, welche den enzymatischen Abbau
15 hemmen, wie zum Beispiel Aprotinin usw.; organischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Alkoholen, zum Beispiel Ethanol, Glycerol, Benzylalkohol usw.; oder Ethylacetat usw.; hydrophoben Mitteln wie zum Beispiel pflanzlichem Öl, Sojabohnenöl, Erdnussöl, Kokosnussöl, Maisöl, Olivenöl, Sonnenblumenöl, "Miglyolen" oder deren Mischungen usw.; pH-regulierenden Mitteln wie zum Beispiel Salpetersäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Citraten usw.;
20 Konservierungsmitteln und den osmotischen Druck regulierenden Mitteln wie zum Beispiel Glycerol, Natriumchlorid, Methylparaoxybenzoat, Benzoesäure usw.; Liposomen- und/oder Emulsionsformulierungen wie zum Beispiel Lecithinen usw.; mikroverkapselten Formulierungen; Treibmitteln wie zum Beispiel Butan.

30 Bevorzugt ist es in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung, dass die Peptidabschnitte gegebenenfalls miteinander assoziiert oder mit einem Träger verbunden in Liposomen eingeschlossen sind, wobei der Einschluss in Liposomen im Sinne der Erfindung nicht zwingend bedeuten muss, dass die Peptide im Inneren der Liposomen vorliegen, ein Einschluss im Sinne der Erfindung kann auch bedeuten, dass die Peptide mit der Membran der Liposomen assoziiert
35 sind, beispielsweise so, dass diese auf der äußeren Membran verankert sind. Eine solche

Darstellung der erfindungsgemäßen Peptide in oder auf den Liposomen ist vorteilhaft, wenn der Fachmann die Liposomen so auswählt, dass sie eine immunstimulierende Wirkung haben. Dem Fachmann sind aus der DE 198 51 282 verschiedene Möglichkeiten bekannt, die immunstimulierende Wirkung von Liposomen zu modifizieren. Bei den Lipiden kann es sich um einfache Lipide handeln, wie beispielsweise Ester und Amide oder um komplexe Lipide wie zum Beispiel um Glycolipide wie Cerebroside oder Ganglioside, um Sphingolipide oder um Phospholipide.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die erste helikale Struktur eine C-terminale Helix und die zweite alpha-helikale Struktur ist eine N-terminale Helix des viralen Hüllproteins. Sofern zur Generierung eines immunogenen Konstruktes beispielsweise gp41 des HIV gewählt wird, kann der Fachmann bevorzugt einen Bereich zwischen der Fusionsdomäne und der N-terminalen Helix und einen Bereich zwischen dem Transmembrandurchgang und der C-terminalen helikalen Struktur wählen, wobei die Fusionsdomäne, der Bereich des Transmembrandurchganges und/oder die alpha-helikale Struktur, sofern es sich um eine handelt, oder die alpha-helikale Strukturen an dem immunogenen Konstrukt ganz oder teilweise beteiligt sein können. Sofern die erfindungsgemäßen Peptide aus HI-Viren gewonnen werden, handelt es sich bevorzugt um Peptide oder rekombinante Proteine oder DNA, die den Aminosäuren 519 bis 564 (N-terminale Sequenz) und 650 bis 683 (C-terminale Sequenz) des HIV-1 Referenz Genoms (NCBI Datenbank: K03455, HIV HXB2 CG) entsprechen, oder Fragmenten bzw. Untereinheiten hiervon, die funktionsanalog zu den oben genannten Domänen sind, das heißt, die in der Lage sind, neutralisierende Antikörper zu induzieren und im besonders bevorzugten Falle einen Infektionsschutz hervorzurufen. Dem Fachmann ist selbstverständlich bekannt, dass aufgrund der Variabilität bei unterschiedlichen Subtypen von HIV-1 Sequenzvariationen innerhalb dieser Sequenzen vorliegen; derartige Sequenzvariationen sind von der Erfindung mit erfasst. Dies trifft auch für Teilsequenzen der Konsensussequenzen 519 bis 564 und 650 bis 683 zu einschließlich chemischer Modifikationen einzelner Aminosäuren, der Verknüpfung der Sequenzen mittels Linker und Sequenzen mit zusätzlichen angefügten Aminosäuren zum Zwecke der Multimerisierung der Sequenzen.

Bevorzugte N-terminale Sequenzen sind:

FLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQ
FLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLL
FLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHML
FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS

FLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLS
FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQLLS
LLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS
FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQVRQLLS
5 FLGVLSAAGSTMGAAATALTVQHTLMK

Bevorzugte C-terminale Sequenzen sind:

10 SQNQQEKNEQELLELDKWAGLWSWFSITNWLWY
SQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWY
SQTQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWY
NEQDLLALDKWASLWNWFDITNWLWYIK
NEQDLLALDKWANLWNWFDISNWLWYIK
NEQDLLALDKWANLWNWFDITNWLWYIR
15 NEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK
NEKDLLALDSWQNLWNWFDITNWLWYIK
NEQELLELDKWASLWNWFSITQWLWYIK
NEQELLALDKWASLWNWFDISNWLWYIK
NEQDLLALDKWDNLWSWFSITNWLWYIK
20 NEQDLLALDKWASLWNWFDITKWLWYIK
NEQDLLALDKWASLWNWFSITNWLWYIK
NEKKLLELDEWASIWNWLDITKWLWYIK

25 Abkürzungen: Ein BuchstabenCode für Aminosäuren:

	A	Alanin
	C	Cystein
	D	Asparaginsäure
30	E	Glutaminsäure
	F	Phenylalanin
	G	Glycin
	H	Histidin
	I	Isoleucin
35	K	Lysin

	L	Leucin
	M	Methionin
	N	Asparagin
	P	Prolin
5	Q	Glutamin
	R	Arginin
	S	Serin
	T	Threonin
	V	Valin
10	W	Tryptophan
	Y	Tyrosin

Erfindungsgemäß wird jeweils aus der Gruppe der N-terminalen Sequenzen und der C-terminalen Sequenzen ein Peptid ausgewählt, wobei durch die Kombination von mindestens zwei Sequenzen das erfindungsgemäße immunogene Konstrukt bereitgestellt werden kann. Es kann auch als rekombinantes Protein oder DNA (Vakzin, Impfstoff) appliziert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Impfstoff (Vakzin) ein Fragment aus Hüllproteinen, ausgewählt aus der Gruppe umfassend GP2, gp20, gp21, gp30, gp36, gp37, gp40, gp41, gp45, gp160, p15E, E2, HA2 und/oder F2. Die Zuordnung dieser zu einzelnen Viren ist im Folgenden dargestellt:

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die jeweils mindestens zwei Peptidabschnitte, rekombinante Proteine oder entsprechende DNA ausgewählt aus der Gruppe umfassend (wobei N für N-terminale Sequenzen und C für C-terminale Sequenzen steht):

	N:	AVGLAIFLLVLAIMAITSSLVAATTLVNQHHTAKV
	C:	SLSDTQDTFGLETSIFDHLVQLFDWTSWKDWIK,
30		bevorzugt bei BIV (transmembranes Hüllprotein gp40);
	N:	GVGLVIMLVIMAIVAAAGASLGVANAIQQSYTKAAVQTLAN
	C:	AMTQLAEEQARRIPEVWESLKDVFWDWSGWFSWLKYI,
		bevorzugt bei CAEV(transmembranes Hüllprotein);
	N:	FGISAIVAIVAATAIARSATMSYVALTEVNKIMEVQNH
35	C:	LAQSMITFNTPDZIAQFGKDLWSHIGNWIPGLGASIIKY,

- bevorzugt bei EIAV1 (transmembranes Hüllprotein gp45);
- N: SSSYSGTKMACPSNRGILRNWYNPVAGLRQSLEQYQVVKQPDYLLVPE
- C: MDIEQNNVQGGKIGIQQLQKWEDWVRWIGNIPQYLK,
- 5 N: GIGLVIVLAIMAIIAAAGAGLGVANAVQQSSYTRTAVQSLANATAAQQN
- C: QVQIAQRDAQRIPDVWKALQEAFDWSGWFSWLKYIPW,
- bevorzugt bei OMVV (transmembranes Hüllprotein gp41);
- N: LGFLGFLATAGSAMGAASLVTAQSRTLLAVIVQQQQQLLDVV
- C: EEAQIQQEKNMYELWKLNNWVDVFGNWFDLTSDWDLTSWIKY,
- 10 N: LGALGFLGAAGSTMGAAVTLTVQARQLLSGIVQQQNNLL
- C: EEAQSQQEKNERDLELDQWASLWNNWFDITKWLWYIK,
- bevorzugt bei SIVmac (transmembranes Hüllprotein gp41);
- N: FLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQ
- 15 FLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLL
- FLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHML
- C: SQNQQEKNEQELLELDKWAGLWSWFSITNWLWY
- SQNQQEKNEQELLELDKWASLWNNWFNITNWLWY
- SQTQQEKNQELLELDKWASLWNNWFDITNWLWY
- 20 N: GIGLVIVLAIMAIIAAAGAGLGVANAVQQSYTRTAVGSLANATAAQQE
- C: EAALQVHIAQRDARRIPDAWKAIQEAFFNNWSSWFSWLKY,
- bevorzugt bei Visnavirus (transmembranes Hüllprotein gp41);
- N: LGFLGFLATAGSAMGARSLTSAQSRTLLAGIVQQQQQLL
- 25 C: EEAQIQEKNMYELQKLNSWDILGNWFDLISWVKYIQ,
- bevorzugt bei HIV-2 (transmembranes Hüllprotein gp36);
- N: WGPTARIFASILAPGVAAAQALREIERLACWSVKQANLTTSL
- C: KFQLMKKHVNKIGVDSPIGSLRGIFGGIGEWAVH,
- bevorzugt bei RSV (transmembranes Hüllprotein gp37);
- 30 N: SVSHLSSDCNDEVQLWSVTARIFASFFAOGVAAQALKEIERLA
- C: ALQAMKEHTEKIRVEDDOIGDWFTRTFGGLGGWLAK,
- bevorzugt bei ALV (transmembranes Hüllprotein gp37);
- N: GLSLIILGIVSLITLIATAVTACCSLAQSIQAAHTVDLSSQNVTKVMGT
- C: IENSPKATLNIADTVDNFLQNLFSNFP SLHSLNKT,
- 35 N: bevorzugt bei JSRV (transmembranes Hüllprotein gp36);

N: AVTLIPLLVLGLGVSTAVATGTAGLGVAVQSYTKLSHQLINDVQALSSTI
 C: KIKNLQEDLEKRRKALADNLFLTGLNGLLPYLLP,
 bevorzugt bei SMRV (transmembranes Hüllprotein gp20);
 N: AIQFIPLVIGLGITTAVSTGTAGLGVSLTWYTKLSHQLISDBQAISSTI
 5 C: KIKNLQDDLEKRRKQLIDNPFWTGFHLLPYVMPL,
 bevorzugt bei SRV (transmembranes Hüllprotein gp20);
 N: AVSLTLAVLLGLGITAGIGGSTALIKGPIDLQQGLTSLQIAIDAD
 C: SMKKLKEKLDKRQLERQDSQNWYEGWFNNWPWFTT,
 bevorzugt bei GALV (transmembranes Hüllprotein p15E);
 10 N: EPVSLTLALLLGGTLMGGIAGVGTGTTALVATQQFQQLQAAMHD
 C: SMAKLRELRSLQRQKLFESQQGWFEGLFNKSPWFTT,
 bevorzugt bei MuLV (transmembranes Hüllprotein p15E);
 N: KALLEAQFRLQLQMQMHTDIQALEESISALEKSL
 C: NMAKLRELRSLQRQQLFDSQQGWFEGLFNKSPWFTT,
 15 bevorzugt bei FeLV (transmembranes Hüllprotein p15E);
 N: TAALITGPQQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNL
 C: DHSGAIRDSMSKLRERLERRREREADQGWFEGLFNKSPWFTT,
 bevorzugt bei PERV (transmembranes Hüllprotein p15E);
 N: TALIKGPIDLQQGLTSLQIAMDTDRLALQDSISKLED
 20 C: SMRRLKERLDRQLEHQKNLSWYEGWFNRSPLWTT
 bevorzugt bei KoRV (transmembranes Hüllprotein p15E);
 N: SPVAALTGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQQ
 C: PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRET,
 bevorzugt bei BLV (transmembranes Hüllprotein gp30);
 25 N: AVPVAWLVSALAMGAGVAGGITGSMSLASGKSLLHEV
 C: PILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREALQ,
 bevorzugt bei HTLV-1 (transmembranes Hüllprotein gp21);
 N: AVPIAVWSVSALAAGTGIAGGVTGSLSLASSKSLLLEVD
 C: SVLQERPPLEKRVITGWGLNWDLGLSQWAREALQ,
 30 bevorzugt bei HTLV-2 (transmembranes Hüllprotein gp30);
 N: FPNINENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGI
 C: KNISEQIDQIKKDEQKIGRGWGLGGKWWTSDWG,
 bevorzugt beim Marburg Virus (transmembranes Glykoprotein gp36);
 N: LITGGRRTREIAIVNAQPKCNPNLHYWTQDEGAAIGLAWIPYFGPAA
 35 C: KNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQWI,

- bevorzugt bei Ebola (transmembranes Protein GP2);
- N: LITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDF
- C: DRLNEVAKNLNESLIDLQELKYEQYKWPWYVW,
- bevorzugt beim SARS-Virus (E2, transmembranes Glykoprotein gp36);
- 5 N: GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAA
- C: HDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILISFA,
- bevorzugt beim Influenza-Virus (Hämagglutinin2, HA2);
- N: FAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSMMLSSQAIDNLRASLETT
- C: IAKLEDAKELLESSKQILRSMKGLSSTSIVY,
- 10 bevorzugt beim Masernvirus (Fusionsprotein F2);
- N: FAGIAIGIAALGVATAAQVTAASLVQAQTNARAAAMKNSIQTNRA
- C: TELSVCNASLQNAVQIKESNHQLQSVSVSSK,
- bevorzugt beim Mumpsvirus (Fusionsglykoprotein F2);
- N: FFGAVIGTIALGVATAAQITAGIALAEAREARKDIALIKDSIVKTH
- 15 C: TNFLEESKTELMKARAIISVGGWHNTESTQ,
- bevorzugt bei HPV-1 (F2 Glykoprotein),

wobei die Viren wie folgt abgekürzt sind:

- | | | |
|----|--------|---|
| 20 | BIV | (Bovines Immundefizienzvirus), |
| | CAEV | (Caprines Arthritis Enzephalitis Virus), |
| | EIAV1 | (Equines infektiöses Anämievirus), |
| | FIV | (Felines Immundefizienzvirus), |
| | OMVV | (Ovines Maedi-Visna Virus), |
| 25 | SIVmac | (Simianes Immundefizienzvirus aus Makaken), |
| | SIVcpz | (Simianes Immundefizienzvirus aus Schimpansen), |
| | HIV-1 | (Humanes Immundefizienzvirus Typ 1), |
| | HIV-2 | (Humanes Immundefizienzvirus Typ 2), |
| | RSV | (Rous Sarkom Virus), |
| 30 | ALV | (Aviäres Leukosevirus), |
| | JSRV | (Jaagsiekte Schaf Retrovirus), |
| | SMRV | (Squirrel Monkey Retrovirus), |
| | SRV | (Simianes Retrovirus), |
| | GALV | (Gibbonaffen Leukämievirus), |
| 35 | MuLV | (Murines Leukämievirus), |

- | | | |
|---|------------|---|
| | FelV | (Felines Leukämievirus), |
| | KoRV | (Koala Retrovirus) |
| | PERV | (Porcines endogenes Retrovirus) |
| | BLV | (Bovines Leukämievirus), |
| 5 | HTLV-1 | (Humanes T-Zell Leukämievirus Typ 1), |
| | HTLV-2 | (Humanes T-Zell Leukämievirus Typ 2), |
| | SARS-Virus | (Erreger des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms) und |
| | HPV-1 | (Humanes Parainfluenza Virus). |
- 10 Durch die Offenbarung der erfindungsgemäßen jeweils mindestens zwei Peptide, Proteindomänen und deren entsprechende DNA und ihrem Vermögen, spezifische Antikörper zum einen zumindest im Fall der Peptide und Proteindomänen zu binden und zum anderen zu induzieren, sind dem Fachmann verschiedene Möglichkeiten offenbart, weitere Peptide zu generieren. Der Fachmann kann durch die Offenbarung der erfindungsgemäßen Lehre weitere
- 15 äquivalente Peptide generieren, die funktionsanalog zu Peptiden sind mit der Sequenzabfolge:

FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS,
 FLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLS,
 FLGFLGAAGSTMGAASLTLTVQARQLLS,
 20 LLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS,
 FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQVRQLLS,
 FLGVLGAAGSTMGAAATLTVQHTLMK,
 FLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQ
 FLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHLL
 25 FLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHML
 AVGLAIFLLVLAIMITSSLVAATTLVNQHHTAKV,
 GVGLVIMLVIMAIVAAAGASLGVANAIQQSYTKAAVQTLAN,
 FGISAIVAAIVAATAIARSATMSYVALTEVKNIMEVQNH,
 SSSYSGTKMACPSNRGILRNWYNPVAGLRQSLEQYQVVKQPDYLLVPE,
 30 GIGLVIVLAIMAIIAAAGAGLGVANAVQQSSYTRTAVQSLANATAAQQN,
 LGFLGFLATAGSAMGAASLVTAQSRTLLAVIVQQQQQLLDVV,
 LGALGFLGAAGSTMGAAVTLTVQARQLLSGIVQQNNLL,
 GIGLVIVLAIMAIIAAAGAGLGVANAVQQSYTRTAVGSLANATAAQQE,
 LGFLGFLATAGSAMGARSLTSAQSRTLLAGIVQQQQQLL,
 35 WGPTARIFASILAPGVAAAQALREIERLACWSVKQANLTTSL,

SVSHLSSDCNDEVQLWSVTARIFASFFAOGVAAQALKEIERLA,
 GLSLIILGIVSLITLIATAVTACCSLAQSIQAAHTVDLSSQNVTKVMGT,
 AVTLIPLLVLGLGVSTAVATGTAGLGVAVQSYTKLSHQLINDVQALSSTI,
 AIQFIPLVIGLGITTAVSTGTAGLGVSLTWYTKLSHQLISDBQAISSTI,
 5 DPVSLTVALLLGGTLMGSLAAGIGTGTAALIETNQFKQLQ,
 AVSLTLAVLLGLGITAGIGGSTALIKGPIDLQQGLTSLQIAIDAD,
 EPVSLTLALLLGGTLMGGIAGVGTGTTALVATQQFQQQLQAAMHD,
 EPISLTVALMLGLTVGGIAAGCGTGTKALLEAQFLQLQMOMHTD,
 SPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQQ,
 10 AVPVAWLVSALAMGAGVAGGITGSMASLASGKSLLHEV,
 AVPIAVWSVSALAAGTGIAGGVGTGSLSLASSKSLLLEVD,
 FPNINENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGI,
 LITGGRRTTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTQDEGAAIGLAWIPYFGPAA,
 LITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDF,
 15 GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAA,
 FAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSMSSQAIDNLRASLETT,
 FAGIAIGIAALGVATAAQVTAAVSLVQAQTNARAAAMKNSIQTNRA,
 FFGAVIGTIALGVATAAQITAGIALAEAREARKDIALIKDSIVKTH,
 wobei es sich hierbei bevorzugt um N-terminale Sequenzen handelt und
 20 NEQDLLALDKWASLWNWFDITNWLWYIK,
 NEQDLLALDKWANLWNWFDISNWLWYIK,
 NEQDLLALDKWANLWNWFDITNWLWYIR,
 NEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK,
 NEKDLLALDSWQNLWNWFDITNWLWYIK,
 25 NEQELLELDKWASLWNWFSITQWLWYIK,
 NEQELLALDKWASLWNWFDISNWLWYIK,
 NEQDLLALDKWDNLWSWFSITNWLWYIK,
 NEQDLLALDKWASLWNWFDITKWLWYIK,
 NEQDLLALDKWASLWNWFSITNWLWYIK,
 30 NEKKLELDEWASIWNWLDITKWLWYIK,
 SQNQKEKNEQELLELDKWAGLWSWFSITNWLWY
 SQNQKEKNEQELLELDKWASLWNWFSITNWLWY
 SQTQKEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWY
 SLSDTQDTFGLETSIFDHLVQLFDWTSWKDWIK,
 35 AMTQLAEEQARRIPEVWESLKDVFDSWGSWFSWLKYI,

LAQSMITFNTPDZIAQFGKDLWSHIGNWIPGLGASIIKY,
 MDIEQNNVQGKIGIQQLQKWEDWVRWIGNIPQYLK,
 QVQIAQRDAQRIPDVWKALQEAFDWSGWFSWLKYIPW,
 EEAQIQQEKNMYELWKLNNWVDVFGNWFDLTSDWLTSWIKY,
 5 EEAQSQQEKNERDLELDQWASLNNWFDITKWLWYIK,
 EAALQVHIAQRDARRIPDAWKAIQEAFFNNWSSWFSWLKY,
 EEAQIQEKNMYELQKLNSWDILGNWFDLISWVKYIQ,
 KFQLMKKHVKNIGVDSDPIGSWLRGIFGGIGEWAVH,
 ALQAMKEHTEKIRVEDDOIGDWFTRTFGGLGGWLAK,
 10 IENSPKATLNIADTVDNFLQNLFSNFPSLHSLNKT,
 KIKNLQEDLEKRRKALADNFLTGLNGLLPYLLP,
 KIKNLQDDLEKRRKQLIDNPFWTGFHLLPYVMPL,
 SMAKLRERFKQRQKLFESQQGQFEGWYNKSPWETT,
 SMKKLKEKLDKRQLERQDSQNWYEGWFNNWPWFET,
 15 SMAKLRERLSQRQKLFESQQGWFEGLFNKSPWFET,
 NMAKLRERLKQRQQLFDSQQGWFEGLFNKSPWFET,
 PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRET,
 PILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREALQ,
 SVLQERPPLEKRVITGWGLNWDLGLSQWAREALQ,
 20 KNISEQIDQIKKDEQKIGRGWGLGGKWWTSDWG,
 KNITDKIDQIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQWI,
 DRLNEVAKNLNESLIDLQELKYEQYEKWPWYVW,
 HDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILISFA,
 IAKLEDAKELLESSKQILRSMKGLSSTSIVY,
 25 TELSVCNASLQNAVQIKESNHQLQSVSVSSK,
 TNFLEESKTELMKARAIISVGGWHNTESTQ, bevorzugt handelt es sich hierbei um C-terminale
 Sequenzen.

30 Beispielsweise ist es möglich, einzelne oder Gruppen von Aminosäuren auszutauschen, ohne
 dass die Aktivität der Peptide in Bezug auf die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe
 nachteilig beeinflusst wird. Für den Austausch derartiger Aminosäuren sei auf die
 entsprechenden Standardwerke der Biochemie und der Genetik verwiesen.

35 Im Stand der Technik sind verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung von Peptiden offenbart.
 Peptide, die von den erfindungsgemäßen Peptiden ausgehend mit solchen Verfahren entwickelt

werden, sind von der erfindungsgemäßen Lehre mit erfasst. Eine Möglichkeit des Generierens von funktionsanalogen Peptiden ist beispielsweise in PNAS USA 1998, Oct. 13; 9521:12179-84, WO 99/6293 und/oder WO 02/38592 beschrieben; diese Lehren sind in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen. Das heißt, sämtliche Peptide, Peptidfragmente oder Strukturen, die Peptide umfassen, die mit den genannten Verfahren – von den erfindungsgemäßen Peptiden ausgehend - generiert werden, sind Peptide im Sinne der Erfindung, sofern sie die erfindungsgemäße Aufgabe lösen, insbesondere neutralisierende Antikörper zu generieren.

Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, dass einzelne Aminosäuren analoge physikochemische Eigenschaften aufweisen, die mit Vorteil dazu führen, dass diese Aminosäuren untereinander ausgetauscht werden können. Hierzu gehören beispielsweise die Gruppe der Aminosäuren (a) Glycin, Alanin, Valin, Leucin und/oder Isoleucin; bzw. die Aminosäuren (b) Serin und Threonin, die Aminosäuren (c) Asparagin und Glutamin, die Aminosäuren (d) Asparaginsäure und Glutaminsäure; die Aminosäuren (e) Lysin und Arginin sowie die Gruppe der aromatischen Aminosäuren (f) Phenylalanin, Tyrosin und/oder Tryptophan. Aminosäuren innerhalb ein und derselben Gruppe (a-f) können untereinander ausgetauscht werden. Weiterhin ist es möglich, dass Aminosäuren durch modifizierte Aminosäuren oder spezifische Enantiomere ausgetauscht werden. Weitere Modifikationen sind gemäß der Lehre nach der WO 99/62933 oder WO 02/38592 möglich.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Peptid einen Linker und/oder einen Spacer, der ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: α -Aminocarbonsäuren sowie deren Homo- und Heterooligomere, α,ω -Aminocarbonsäuren sowie deren verzweigte Homo- oder Heterooligomere, sonstige Aminosäuren sowie die linearen und verzweigten Homo- oder Heterooligomere (Peptide); Amino-oligoalkoxy-alkylamine; Maleinimidocarbonsäure-Derivate; Oligomere von Alkylaminen; 4-Alkylphenyl-Derivate; 4-Oligoalkoxyphenyl- oder 4-Oligoalkoxyphenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylmercaptophenyl- oder 4-Oligoalkylmercaptophenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylaminphenyl- oder 4-Oligoalkylaminophenoxy-Derivate; (Oligoalkylbenzyl)-phenyl- oder 4-Oligoalkylbenzyl)-phenoxy-Derivate sowie 4-Oligoalkoxybenzyl)-phenyl- oder 4-Oligoalkoxybenzyl)-phenoxy-Derivate; Trityl-Derivate; Benzyloxyaryl- oder Benzyloxyalkyl-Derivate; Xanthen-3-yl-oxyalkyl-Derivate; (4-Alkylphenyl)- oder ω -(4-Alkylphenoxy)-alkansäure-Derivate; Oligoalkyl-Phenoxyalkyl- oder Oligoalkoxy-phenoxyalkyl-Derivate; Carbamat-Derivate; Amine; Trialkylsilyl- oder Dialkyl-alkoxysilyl-Derivate; Alkyl- oder Aryl-Derivate und/oder Kombinationen davon; weitere mögliche Strukturen werden in der EP 1 214 350 beschrieben, die in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen sind.

Bevorzugt können synthetische Peptide, die den N-terminalen und/oder C-terminalen Sequenzen entsprechen oder Fragmente hiervon sind, durch chemische Crosslinker multimerisiert werden oder an ein Trägermolekül wie BSA, Dextran, KLH oder andere gekoppelt werden. Die hierzu
5 verwendeten chemischen Crosslinker sind in "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996 aufgelistet, die in den Offenbarungsgehalt der erfindungsgemäßen Lehre mit aufgenommen sind. Bevorzugte Crosslinker sind homobifunktionale Crosslinker, bevorzugt: NHS-Ester, wie DSP, DTSSP, DSS, BS, DST, Sulfo-DST, BSOCOES, Sulfo-BSOCOES, EGS, Sulfo-EGS, DSG oder DSC, homobifunktionale Imidoester, wie DMA, DMP, DMS oder DTBP,
10 homobifunktionale Sulfhydryl-reaktive Crosslinker, wie DPDPB, BMH oder BMOE, Difluorobenzenderivate, wie DFDNB oder DFDNPS, homobifunktionale photoreaktive Crosslinker, wie BASED, homobifunktionale Aldehyde, wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd, Bis-Epoxyde, wie 1,4-Butandiol diglycidylether, homobifunktionale Hydrazide, wie Adipinsäuredihydrazide oder Carbohydrazide, Bis-diazoniumderivate, wie o-Tolidin, bisdiazotisiertes Benzidin oder
15 Bisalkylhaloid.

Bevorzugt sind auch heterobifunktionale Crosslinker, insbesondere aminreaktive und sulfhydrylreaktive Crosslinker, wie SPDP, LC-SPDP, Sulfo-LC-SPDP, SMPT, Sulfo-LC-SMPT, SMCC, Sulfo-SMCC, MBS, Sulfo-MBS, SIAB, Sulfo-SIAB, SMPB, Sulfo-SMBP, GMBS, Sulfo-
20 GMBS, SIAX, SIAXX, SIAC, SIACX oder NPIA, carbonylreaktive und sulfhydrylreaktive Crosslinker, wie MPBH, M_2C_2H oder PDPH, aminreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie NHS-ASA, Sulfo-NHS-ASA, Sulfo-NHS-LC-ASA, SASD, HSAB, Sulfo-HSAB, SANPAH, Sulfo-SANPAH, ANB-NOS, SAND, SADP, Sulfo-SADP, Sulfo-SAPB, SAED, Sulfo-SAMCA, p-Nitrophenyldiazopyruvat oder PNP-DTP, Sulfhydryl und photoreaktive Crosslinker, wie ASIB,
25 APDP, Benzophenon-4-iodoacetamid oder Benzophenon-4-maleimid, carbonylreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie ABH, carboxylatreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie ASBA, argininreaktive Crosslinker, wie APG, trifunktionale Crosslinker, wie 4-Azido-2-nitrophenylbiozotin-4-nitrophenylester, Sulfo-SEBD, TSAT und/oder TMEA.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Peptide und rekombinant hergestellte Strukturen durch Peptidbrücken mit einer Länge von 0 bis 50 Aminosäuren verbunden. Dies beinhaltet auch rekombinante Proteine, die aus zwei N-terminalen und einer C-terminalen Sequenz bestehen oder Hexamere bestehend aus drei N-terminalen Sequenzen und drei C-terminalen Sequenzen, oder Multimere der zuvor aufgeführten
35 rekombinanten Strukturen, wobei zwischen den N- und den C-terminalen Sequenzen je eine

Peptidbrücke von 0 bis 50 Aminosäuren vorhanden sein kann. Die Peptide können zum Zwecke der Aufreinigung, Solubilisierung bzw. der Konformationsveränderung mit spezifischen Fusionsanteilen entweder am N- oder am C-Terminus versehen sein, wie zum Beispiel CBP (Calmodulin-Bindungsprotein), His-Tag und/oder andere. Ähnliche Konstrukte können auch von DNA, die zum Immunisieren verwendet wird, kodiert werden.

Nach einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Peptidgemisch und Proteingemisch ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 10 a) mindestens zwei Peptide oder rekombinante Proteine umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 bis 104,
- b) Peptide oder rekombinante Proteine umfassend eine Aminosäuresequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Aminosäuresequenz gemäß a) funktionsanalog zu sein,
- 15 c) Peptide oder rekombinante Proteine gemäß einer Aminosäuresequenz a) oder b), welche durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Aminosäuresequenz gemäß a) oder b) ist.
- 20 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Aminosäuresequenz, z.B. das Peptid oder rekombinante Protein, was eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID No 1 bis 104 funktionsanalog zu sein, zu diesen zumindest 40 % homolog.
- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind diese Aminosäuresequenzen mindestens 60 %, vorzugsweise 70 %, bevorzugt 80 %, ganz besonders bevorzugt 90 %, homolog zu einer der Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID No 1 bis 104.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besteht das Peptid oder rekombinante Protein im Wesentlichen aus der Aminosäuresequenz

- a) Synthetische Peptide E1 (LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLS, FLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQNNLLRAIEAQQHLL und E2 (NEQELLELDKWASLWNWFDITNWL oder

SQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWY)

b) Hybrid I (HIV-Sequenzen unterstrichen)

5 LITQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKKEGLCVALKE
ECCFYVDHSGAIRDSMSKLRLRRLRRRREELDKWASLWNWFN

c) Hybrid II (HIV-Sequenzen unterstrichen)

10 LITGASVTLTVQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKKE
GLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRLRRLRRRREELDKWASLWNWFNITNWLWY

d) Loop I: (HIV-Sequenzen unterstrichen)

15 LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSSSPSSNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL

Insbesondere besteht das Peptid aus Abwandlungen dieser Sequenzen, die nach der WO 99/62933 und der WO 02/38592 gewonnen wurden, wobei diese Peptide selbstverständlich Antikörper im Sinne der Erfindung generieren und binden.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Peptidabschnitte des immunogenen Konstruktes, wie bereits allgemein ausgeführt, untereinander an andere Peptide oder Proteine oder mit einem Träger assoziiert. Es kann beispielsweise vorgesehen sein, dass die mindestens zwei erfindungsgemäßen Peptide des immunogenen Konstruktes über Peptid- oder nichtpeptidische Bindungen miteinander verbunden sind. Die nichtpeptidischen Bindungen sind dem Fachmann bekannt und umfassen beispielsweise Imino-, Ester-, Azo-, Hydrazit-, Semikarbazit- und andere Bindungen. Bei den Trägern im Sinne der Erfindung kann es sich um Proteine handeln, die aufgrund ihres immunogenen Verhaltens die Antikörperantwort stimulieren, aber auch um den Fachmann bekannte pharmazeutische Hilfsstoffe wie zum Beispiel QS21, GPI- 25 0100 oder andere Saponine, Wasser-Öl-Emulsionen wie beispielsweise Montanide, Polylysin, Polyagenin-Verbindungen oder andere, wie zum Beispiel phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Wasser, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen und dergleichen mehr. 30

Die Erfindung umfasst auch Antikörper, die durch die erfindungsgemäßen Peptide bzw. durch das erfindungsgemäße immunogene Konstrukt hergestellt oder induziert werden. Die Peptide

bzw. Proteine können hierbei chemisch hergestellt sein oder durch rekombinante DNA-Technologie oder anders. Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Antikörper wird mindestens ein erfindungsgemäßes immunogenes Konstrukt so mit einem Organismus in Kontakt gebracht, dass dieser in der Lage ist, gegen dieses Konstrukt Antikörper herzustellen, die
5 durch den Fachmann mit den bekannten Methoden gewonnen und isoliert werden können.

Die Erfindung betrifft aber auch anti-Idiotyp-Antikörper. Antikörper tragen Idiotypen, Bereiche in der Nähe ihrer Antigen-Erkennungsstellen, die selbst antigen und in der Lage sind, die Antikörperproduktion zu stimulieren. Antikörper, die spezifisch für die Antigen-Bindungsstellen sind, werden Paratop-spezifische anti-Idiotyp-Antikörper genannt. Diese Antikörper tragen die gleiche
10 Erkennungsstelle wie das Antigen, das anfangs die Antikörperproduktion stimulierte; Marx, "Making Antibodies without Antigens", 1986. So können im Sinne der Erfindung Paratop-spezifische anti-idiotypische Antikörper mit teilweise der gleichen Struktur wie HIV, SARS oder andere Viren durch Immunisierung eines Tieres mit einem monoclonalen HIV-1-, SARS- oder FeLV-Antikörper zu den genannten Viren hergestellt werden. Diese Paratop-spezifischen anti-
15 idiotypischen Antikörper, die eine bestimmte gleiche Struktur wie die immunogenen Teile der genannten Viren tragen, sind geeignet, eine Immunantwort auszulösen und können demgemäß ebenfalls als Impfstoff verwendet werden.

Die Erfindung umfasst auch pharmazeutische Mittel, die mindestens eines der erfindungsgemäßen immunogenen Konstrukte umfassen, gegebenenfalls zusammen mit einem
20 pharmazeutisch verträglichen Träger. Ein pharmazeutisches Mittel im Sinne der Erfindung ist jedes Mittel im Bereich der Medizin, welches in der Prophylaxe, Diagnose, Therapie, Verlaufskontrolle oder Nachbehandlung von Patienten eingesetzt werden kann, die mit umhüllten Viren einschließlich Retroviren so in Kontakt gekommen sind, dass sich zumindest zeitweise eine pathogene Modifikation des Gesamtzustandes bzw. des Zustandes einzelner Teile des
25 Organismus etablieren konnte. So ist es beispielsweise möglich, dass das pharmazeutische Mittel im Sinne der Erfindung eine Vakzine oder ein Immuntherapeutikum ist. Das pharmazeutische Mittel im Sinne der Erfindung kann neben dem immunogenen Konstrukt beispielsweise ein akzeptables Salz oder Komponenten dieser umfassen. Hierbei kann es sich beispielsweise um Salze anorganischer Säuren handeln wie zum Beispiel der Phosphorsäure
30 bzw. um Salze organischer Säuren.

Weiterhin ist es möglich, dass die Salze frei von Carboxylgruppen sind und von anorganischen Basen abgeleitet wurden wie zum Beispiel Natrium, Kalium, Ammonium, Kalzium oder Eisenhydroxyde oder auch von organischen Basen wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethyl-

aminoethanol, Histidin und andere. Beispiele für flüssige Träger sind sterile wässrige Lösungen, die keine weiteren Materialien oder aktiven Ingredienzien umfassen und beispielsweise Wasser oder solche, die einen Puffer wie zum Beispiel Natriumphosphat mit einem physiologischen pH umfassen oder eine physiologische Salzlösung bzw. beides, wie zum Beispiel

5 phosphatgepufferte Natriumchloridlösung. Weitere flüssige Träger können mehr als nur ein Puffersalz, wie zum Beispiel Natrium- und Kaliumchlorid, Dextrose, Propylenglycol, Polyethylenglycol oder andere umfassen. Flüssige Zusammensetzungen der pharmazeutischen Mittel können zusätzlich eine flüssige Phase, jedoch unter dem Ausschluss von Wasser, umfassen. Beispiele solcher zusätzlichen flüssigen Phasen sind Glycerin, Pflanzenöle, orga-

10 nische Ester oder Wasser-Öl-Emulsionen. Die pharmazeutische Zusammensetzung bzw. das pharmazeutische Mittel enthält typischerweise einen Gehalt von mindestens 0,1 Gew% der erfindungsgemäßen Peptide bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zusammensetzung. Die jeweilige Dosis bzw. der Dosisbereich für die Gabe des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittels ist groß genug, um den gewünschten prophylaktischen oder therapeutischen Effekt der

15 Bildung von neutralisierenden Antikörpern zu erreichen. Hierbei sollte die Dosis nicht so gewählt werden, dass unerwünschte Nebeneffekte dominieren. Im Allgemeinen wird die Dosis mit dem Alter, der Konstitution, dem Geschlecht des Patienten variieren sowie selbstverständlich auch in Bezug auf die Schwere der Erkrankung. Die individuelle Dosis kann sowohl in Bezug auf die primäre Erkrankung als auch in Bezug auf Eintreten zusätzlicher Komplikationen eingestellt

20 werden. Die exakte Dosis ist durch einen Fachmann mit bekannten Mitteln und Methoden feststellbar, beispielsweise durch die Feststellung des Antikörpertiters in Abhängigkeit der Dosis bzw. in Abhängigkeit des Impfschemas oder der pharmazeutischen Träger und ähnlichem. Die Dosis kann hierbei je nach Patient individuell gewählt werden. Beispielsweise kann eine vom Patienten noch tolerierte Dosis des pharmazeutischen Mittels eine solche sein, deren Bereich im

25 Plasma oder in einzelnen Organen lokal im Bereich von 0,1 bis 10000 μM liegt, bevorzugt zwischen 1 und 100 μM . Alternativ kann die Dosis auch in Bezug auf das Körpergewicht des Patienten bezogen berechnet werden. In einem solchen Fall wäre beispielsweise eine typische Dosis des pharmazeutischen Mittels in einem Bereich zwischen 0,1 μg bis 100 μg per kg Körpergewicht einzustellen, bevorzugt zwischen 1 und 50 $\mu\text{g/kg}$. Weiterhin ist es jedoch auch

30 möglich, die Dosis nicht in Bezug auf den gesamten Patienten, sondern in Bezug auf einzelne Organe zu bestimmen. Dies wäre beispielsweise dann der Fall, wenn das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel beispielsweise in einem Biopolymer, eingebracht in den jeweiligen Patienten, in der Nähe bestimmter Organe mittels einer Operation platziert wird. Dem Fachmann sind mehrere Biopolymere bekannt, die Peptide oder rekombinante Proteine in einer ge-

35 wünschten Art und Weise freisetzen können. Ein solches Gel kann beispielsweise 1 bis 1000 μg

der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, z.B. Peptide oder rekombinanten Proteine bzw. des pharmazeutischen Mittels pro ml Gelkomposition beinhalten, bevorzugt zwischen 5 bis 500 µg/ml und besonders bevorzugt zwischen 10 und 100 mg/ml. In solch einem Fall wird das therapeutische Mittel als feste, gelartige oder als flüssige Komposition verabreicht.

- 5 Bevorzugt wird das pharmazeutische Mittel als Vakzine nach der Infektion oder als vorbeugende Impfung eingesetzt. Die Impfung erfolgt vorteilhafterweise so, dass es nach der Applikation im Organismus zur Entwicklung eines aktiven Impfschutzes kommt. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die Impfung unmittelbar vor oder zeitnah nach der Infektion erfolgt oder als Therapie mehrfach appliziert wird. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Induktion einer Antwort
- 10 neutralisierender Antikörper zu nahezu jedem Zeitpunkt auch nach der Infektion von Vorteil sein kann, so dass eine Impfung im Sinne der Erfindung auch eine Applikation des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittels Wochen, Monate, Jahre bzw. Jahrzehnte nach der Infektion mit dem jeweiligen Virus sein kann.

- Zur Unterstützung der Immunantwort kann das pharmazeutische Mittel in einer bevorzugten
- 15 Ausführungsform der Erfindung weitere immunogene Komponenten umfassen, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bordetella, Haemophilus, Borrelia, Pseudomonas, Corynebakterien, Mycobakterien, Streptokokken, Salmonellen, Pneumokokken, Staphylokokken und/oder Clostridien. Es ist bekannt, dass die alleinige Gabe von Antigenen häufig nicht zu einer ausreichenden Bildung von Antikörpern führt. Da Epitope unter bestimmten Voraussetzungen
- 20 und Bedingungen nur schwach immunogen sein können, kann eine entsprechende Immunantwort, wie beispielsweise die Bildung der Antikörper, gesteigert werden, wenn schwach immunogene Substanzen in ihrer Immunogenität erhöht werden. Neben den bekannten Aluminiumverbindungen, lipidhaltigen Verbindungen oder auch KLH und anderen ist es im Sinne der Erfindung möglich, die Immunantwort durch gemeinsame oder parallele Verabreichung
- 25 bestimmter Strukturen aus Mikroorganismen zu erhöhen. Der Wirkmechanismus dieser zusätzlich gegebenen, stark immunogenen Strukturen ist im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Lehre nicht relevant, entscheidend ist, dass es zu einer gewünschten Immunantwort kommt. Diese Immunantwort kann beispielsweise durch die Gabe der genannten immunogenen Teile von Mikroorganismen beispielsweise auch dadurch erfolgen, dass diese Strukturen
- 30 zunächst eine so genannte innate Immunreaktion im Körper aktivieren und hierdurch im weiteren Verlauf die Induktion einer Antikörperantwort im Sinne von Fearon, 1997 ermöglichen. Eine gegebenenfalls erforderliche Inaktivierung der genannten mikrobiellen Immunogene kann durch chemische oder physikalische Behandlung erfolgen, beispielsweise durch eine Behandlung mit Formaldehyd, durch Hitzebehandlung, durch UV-Bestrahlung oder durch Ultraschallbehandlung.

Selbstverständlich kann die immunogene Komponente auch von einem anderen Virus abgeleitet sein, bevorzugt ausgewählt aus der Familie der Hepadnaviridae, Herpesviridae, Poxviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Togaviridae oder Flaviviridae; das Virus kann zum Beispiel ein HIV, Herpes Simplex Virus, Influenza Virus, Hepatitis-Virus sein. Die für die Peptide bereits dargestellten Modifikationen sind auch auf das pharmazeutische Mittel anwendbar.

Die immunogene Komponente kann in diesem Falle ein Protein dieser Viren oder ein Fragment - also ein Peptid - dieser sein. Es ist beispielsweise möglich, die immunogene Komponente in dem pharmazeutischen Mittel mit beiden erfindungsgemäßen Peptiden oder rekombinanten Proteinen, das heißt dem erfindungsgemäßen Konstrukt, zu kombinieren. Eine derartige Kombination im Sinne der Erfindung erfolgt bevorzugt durch eine kovalente Bindung. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die immunogene Komponente und die erfindungsgemäßen Peptide zusammen an einen Träger adsorbiert werden, wobei dieser Träger beispielsweise ein Albumin, ein KLH oder ein anderer pharmazeutisch verträglicher Träger sein kann.

Die Erfindung umfasst demgemäß auch ein Verfahren zur Herstellung eines immunogenen Konstruktes, welches aus den (a) erfindungsgemäßen Peptiden oder rekombinanten Proteinen bzw. (b) dem erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel und als (c) zusätzliche Immunogene verwendete Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien oder Viren, besteht. Ein bevorzugtes Verfahren umfasst die Schritte des Behandeln der erfindungsgemäßen Peptide und/oder der immunogenen mikrobiellen Strukturen mit einem für die kovalente Bindung geeigneten Aktivator, gegebenenfalls das Abtrennen von überschüssigem Aktivator, das Inkubieren der so erhaltenen Lösung und die Reinigung dieser. Als Aktivator für die kovalente Bindung können bevorzugt homo-, hetero-, bifunktionelle Cross-Linker verwendet werden wie zum Beispiel N-Hydroxysuccinimid-Ester, Imido-Ester, Maleinimido-Derivate, N-Hydroxysuccinimide, Pyridyl-disulfide oder Ketogruppen enthaltende Verbindungen. Die Reinigung kann mittels Zentrifugation, Filtration, Fällung, Dialyse oder einem chromatographischen Verfahren erfolgen. Als chromatographische Verfahren sind die Gelfiltration, die affinitätschromatographische Reinigung oder die Ionenaustauscher-Chromatographie bevorzugt. Wenn die erfindungsgemäßen Peptide in dem pharmazeutischen Mittel mit einer immunogenen Mikroorganismuskomponente zusammen auf einem absorbierbaren Trägermaterial aufgebracht werden, kann es sich bei diesen Trägern um Metalle, unlösliche oder kolloidale Metallverbindungen oder Polymerverbindungen und auch um Lipidvesikel handeln. Bei den Metallen sind Gold oder Platin oder Metalle wie Aluminium oder Eisen bevorzugt; bei den unlöslichen oder kolloidalen Metallverbindungen sind unter anderem Adjuvantien wie beispielsweise Aluminium-, Zink- und/oder Eisenhydroxid bevorzugt. Bei den

Polymerverbindungen können alle resorbierbaren bzw. biologisch abbaubaren Materialien verwendet werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, nicht abbaubare Polymerverbindungen zu verwenden, wenn diese physiologisch akzeptiert werden, wie zum Beispiel Latex. Neben den Mikroorganismen oder Teilen hiervon bzw. anderen Viren als
5 Immunogen können selbstverständlich auch Nukleinsäuren verwendet werden, um eine Immunantwort auf die erfindungsgemäßen Peptide zu verstärken.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen die pharmazeutischen Mittel auch Zytokine, insbesondere Interleukin-2 und/oder CSF. Derartige Stoffe sind zur Wirkungsverstärkung, vorzugsweise zur Immunstimulation, verwendbar. Diese werden in
10 bekannten Methoden mit den erfindungsgemäßen Peptiden oder dem pharmazeutischen Mittel gemischt und in einer geeigneten Formulierung und Dosierung verabreicht. Formulierung, Dosierung und geeignete Komponenten sind dem Fachmann bekannt.

Die Erfindung betrifft auch die Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID Nr. 1-104 insbesondere zur Verwendung in der Medizin. Diese Sequenzen stellen eine Auswahl aus bekannten größeren
15 Aminosäuresequenzbereichen dar, wobei die Auswahl zu dem überraschenden Ergebnis der Induktion neutralisierender Antikörper führt, vor allem, wenn mindestens zwei der Aminosäuresequenzen zusammen eingesetzt werden. Insbesondere bevorzugt sind die Aminosäuresequenzen im Rahmen einer medizinischen Indikation, d. h. als therapeutisch zweckgebundene Aminosäuresequenzen. Selbstverständlich nicht beansprucht ist die bekannte
20 Sequenz ELDKWA und andere in den genannten Referenzen offenbarte Sequenzen. Die Erfindung betrifft auch die neutralisierenden Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen immunogenen Konstrukt hergestellt werden.

Die Erfindung betrifft auch einen Diagnose-Kit, der ein erfindungsgemäßes pharmazeutisches
25 Mittel umfasst. Dieser Kit kann beispielsweise zur Diagnose und zum Monitoring des Verlaufs und/oder der Therapie von Viruserkrankungen eingesetzt werden, wobei folgende Viren bevorzugt ausgewählt sind:

- BIV (Bovines Immundefizienzvirus)
- CAEV (Caprines Arthritis Enzephalitis Virus)
- 30 EIAV1 (Equines infektiöses Anämievirus)
- FIV (Felines Immundefizienzvirus)
- OMVV (Ovines Maedi-Visna Virus)
- SIVmac (Simianes Immundefizienzvirus aus Makaken)
- SIVcpz (Simianes Immundefizienzvirus aus Schimpansen)

- HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus Typ 1)
HIV-2 (Humanes Immundefizienzvirus Typ 2)
RSV (Rous Sarkom Virus)
ALV (Aviäres Leukosevirus)
5 JSRV (Jaagsiekte Schaf Retrovirus)
SMRV (Squirrel Monkey Retrovirus)
SRV (Simianes Retrovirus)
GALV (Gibbonaffen Leukämievirus)
MuLV (Murines Leukämievirus)
10 FeLV (Felines Leukämievirus)
BLV (Bovines Leukämievirus)
HTLV-1 (Humanes T-Zell Leukämievirus Typ 1)
HTLV-2 (Humanes T-Zell Leukämievirus Typ 2)
SARS-Virus (Erreger des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms)
15 HPV-1 (Humanes Parainfluenza Virus) und andere umhüllte Viren.

Der Diagnostik-Kit dient zum Nachweis antiviraler Antikörper gegen Epitope auf dem immunogenen Konstrukt, zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das immunogene Konstrukt und/oder zum Nachweis des Virus.

20

Der Kit kann gegebenenfalls eine Anleitung oder Informationen zur pharmazeutischen Bereitstellung bzw. zu therapeutischen Behandlungsverfahren beinhalten. Die Information kann beispielsweise ein Beipackzettel sein oder ein anderes Medium, welches dem Anwender Informationen darüber gibt, mit welchem therapeutischen Verfahren bzw. mit welchem
25 Impfschema die genannten Substanzen, das heißt insbesondere die erfindungsgemäßen Peptide bzw. das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel, insbesondere Vakzine, einzusetzen sind. Der Beipackzettel enthält insbesondere detaillierte und/oder wesentliche Informationen über das Heilverfahren. Selbstverständlich ist es nicht zwingend erforderlich, dass diese Information auf einem Beipackzettel formuliert ist, es ist auch möglich, dass diese Information beispielsweise
30 über das Internet mitgeteilt wird.

Der Diagnose-Kit betrifft zum einen einen Immunoassay für den Nachweis von Antikörpern, die gegen die umhüllten Viren einschliesslich der Retroviren gerichtet sind, zum anderen einen Nachweis der Virusbelastung (Virusantigene) im Organismus. Dazu werden entsprechende Proben genommen, in denen Antikörper oder Virenantigene detektiert werden sollen. Eine Probe

im Sinne der Erfindung ist die Bezeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches oder chemisches Gut oder eines Teiles bzw. einer kleinen Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll, insbesondere auf das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern.

- 5 Die Probenentnahme erfolgt insbesondere so, dass die entnommene Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Selbstverständlich kann es auch bevorzugt sein, dass die entnommene Teilmenge nicht dem Durchschnitt einer größeren Menge entsprechen soll. Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge, die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, beispielsweise das Blut in
- 10 einem Organismus bzw. die Lymphe, zulässt. Für die Untersuchung können die Proben durch Mischen, Zugabe von Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung von Proben bekannt. Eine Probe können insbesondere alle biologischen Materialien sein, wie biologische Gewebe und Flüssigkeiten, zum Beispiel Blut, Lymphe, Urin, Gehirnflüssigkeit und andere. Wie hier verwendet, bezieht sich eine
- 15 Probe demgemäß auf jede Substanz, die neutralisierende Antikörper enthält oder vermutlich enthält, und umfasst eine Probe von Gewebe oder Flüssigkeit, die von einem Individuum oder Individuen isoliert worden ist, einschließlich, aber nicht beschränkt auf zum Beispiel Haut, Plasma, Serum, Lymphe, Urin, Tränen, Abstriche, Gewebeproben, Organe, Tumoren und auch auf Proben von Bestandteilen von Zellkulturen. Eine solche Probe kann zum Beispiel wie folgt auf
- 20 das Vorhandensein von bindenden Antikörpern untersucht werden:
- a) Beschichten einer festen Phase mit dem erfindungsgemäßen immunogenen Konstrukt,
 - b) Inkubieren der festen Phase mit der biologischen Probe,
 - 25 c) Inkubieren der festen Phase mit einem anti-humanen Antikörper, der die Klassen IgA, IgM, IgG nachweisen kann, der mit einer nachweisbaren Kennzeichnung markiert ist
- und
- 30 d) Nachweis der Kennzeichnung, um die Anwesenheit der bindenden Antikörper gegen die genannten Viren in der Probe zu bestimmen.

Die Probe kann verschiedene Konzentration von Harnstoff aber auch keinen Harnstoff aufweisen (Aviditätsbestimmung).

Da neutralisierende Antikörper auf diese Art nur schwer und nicht quantitativ nachgewiesen werden können, erfolgt deren Nachweis in einem Infektionsassay, in dem die Hemmung der Infektion von uninfizierten Zellen durch das jeweilige Virus aus der obigen Liste durch die neutralisierenden Antikörper nachgewiesen wird.

Durch Wettbewerbsanalysen mit dem immunogenen Konstrukt kann aus der Menge der neutralisierenden Antikörper der Anteil der spezifisch gegen die Epitope auf dem immunogenen Konstrukt quantitativ bestimmt werden. Da eine Korrelation zwischen der Menge der im obigen Text gefundenen, das immunogene Konstrukt bindenden Antikörper, und der Menge der neutralisierenden Antikörper gefunden wurde, kann ein neuer Schnelltest durchgeführt werden, in dem erstmals in kurzer Zeit viele Seren auf neutralisierende Antikörper getestet werden können. Dieser Test erlaubt Aussagen über den Erfolg der Immunisierung im Fall einer prophylaktischen Applikation wie auch über die Progression der Infektion. Auch ein Monitoring des Therapieerfolges im Fall der therapeutischen Applikation ist möglich. Demgemäß kann auch ein Kit zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das immunogene Konstrukt auf der Basis eines Neutralisationsassays mit entsprechenden Wettbewerbsanalysen und ein neuartiges Schnell-Verfahren zum Nachweis neutralisierender Antikörper auf der Basis eines ELISAs mit dem vollständigen immunogenen Konstrukt bereitgestellt werden.

Der Diagnose-Kit umfasst auch den Nachweis von viralem Antigen zur Bestimmung der Viruslast in den oben aufgelisteten Proben wie folgt:

- a) Beschichten einer festen Phase mit Antikörpern gegen die gesuchten viralen Antigene, die in einem Tier oder einem Menschen nach Immunisierung mit dem erfindungsgemäßen immunogenen Konstrukt gewonnen wurden,
- b) Inkubieren der festen Phase mit der biologischen Probe,
- c) Inkubieren der festen Phase mit einem zweiten, unterschiedlichen vom ersten, Antikörper gegen die gesuchten viralen Antigene, der ebenfalls in einem Tier oder einem Menschen nach Immunisierung mit dem erfindungsgemäßen immunogenen Konstrukt gewonnen wurden,
- d) Nachweis des gekoppelten zweiten Antikörpers um so die Menge des gebundenen Antigens zu bestimmen.

Die Erfindung betrifft auch eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe umfassend die Sequenzen SEQ ID No 1 bis 104 zur Verwendung auf dem Gebiet der therapeutischen Behandlung sowie der Diagnostizierverfahren am menschlichen oder tierischen Körper.

5

Die Erfindung betrifft demgemäß Peptide, Peptidfragmente, rekombinante Proteine bzw. deren Fragmente, die membranassoziierten Proteinen von bestimmten Viren für bestimmte therapeutische bzw. diagnostische Anwendungen. Bevorzugt ist die Verwendung einer Mischung aus mindestens zwei Peptiden oder rekombinanten Proteinen aus der Sequenzabfolge eines viralen Hüllproteins gemäß der erfindungsgemäß beschriebenen Auswahl.

10

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Induktion einer Antikörperantwort, wobei das erfindungsgemäße immunogene Konstrukt und/oder das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel mit einem Organismus, bevorzugt einem Menschen oder einem Tier, in Kontakt gebracht werden. Bevorzugt umfasst dieses Verfahren die Formulierung des neutralisierenden Antikörpers mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger. Durch die Offenbarung der erfindungsgemäßen Peptide ist es dem Fachmann möglich, diese als Antigen zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern zu verwenden. Dem Fachmann ist hierbei bekannt, dass er die erfindungsgemäßen Peptide, die selbstverständlich auch als das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel verwendet werden können, in verschiedenen Dosierungen einem Organismus, insbesondere einem humanen Patienten, applizieren kann. Die Applikation sollte hierbei so erfolgen, dass eine möglichst große Menge neutralisierender Antikörper generiert wird. Die Konzentration und die Art der Applikation kann vom Fachmann durch Routineversuche eruiert werden. Möglich sind folgende Applikationen: oral in Form von Pulver, Tabletten, Saft, Tropfen, Kapseln und
20
ähnlichem; rektal in Form von Zäpfchen, Lösungen und ähnlichem; parenteral in Form von Injektionen, Infusionen von Lösungen, Inhalationen von Dämpfen, Aerosolen, Stäuben und Pflastern
25
sowie lokal in Form von Salben, Pflastern, Umschlägen, Spülungen und ähnlichem.

20

25

Bevorzugt kann das In-Kontakt-Bringen des immunogenen Konstruktes und/oder des pharmazeutischen Mittels prophylaktisch oder therapeutisch erfolgen. Bei einer prophylaktischen Impfung soll die Infektion mit den genannten Viren zumindest dergestalt verhindert werden, dass nach Eindringen einzelner Viren, beispielsweise in eine Wunde, eine weitere Vermehrung dieser stark vermindert wird oder dass eingedrungene Viren nahezu vollständig abgetötet werden. Bei einer therapeutischen Induktion einer Immunantwort liegt bereits eine Infektion des Patienten vor

30

und die Induktion der neutralisierenden Antikörper erfolgt, um die bereits im Körper befindlichen Viren abzutöten bzw. in ihrer Vermehrung zu hemmen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Generierung eines Antikörpers, bevorzugt eines
5 neutralisierenden Antikörpers gegen eine Erkrankung mit umhüllten Viren einschliesslich der
Retroviren, wobei ein Organismus mit einem immunogenen Konstrukt, gegebenenfalls
zusammen mit einer immunogenen Komponente und/oder einem pharmazeutischen Mittel
gemäß der Erfindung in Kontakt gebracht wird und so eine humorale Immunantwort durch
10 Bildung von Antikörpern induziert wird und folgend die Antikörper aus dem Organismus
gewonnen werden. Bevorzugt können die so gewonnenen neutralisierenden Antikörper zur
passiven Immunisierung verwendet werden.

Dabei können auch monoklonale Antikörper gewonnen werden, die u. a. nach entsprechender
Humanisierung eingesetzt werden. Dabei können auch Antikörper-produzierende Zellen aus
15 geimpften bzw. infizierten Individuen gewonnen werden, die neutralisierende Antikörper
produzieren, die gegen das erfindungsgemäße immunoge Konstrukt gerichtet sind, und in Form
monoklonaler Antikörper bei der passiven Immunisierung appliziert werden.

Bei der passiven Immunisierung erfolgt im Körper des Patienten keine eigene Immunreaktion
20 bzw. im Wesentlichen keine eigene Immunreaktion auf bestimmte Viren, sondern die Antikörper
werden beispielsweise in Form von Heilseren in den Patienten eingebracht. Passive
Immunisierung hat im Gegensatz zur aktiven Immunisierung im Wesentlichen die Aufgabe, eine
bereits erfolgte Infektion möglichst schnell zu heilen oder aber sofort gegen eine Infektion mit
Viren zu schützen. Dem Fachmann sind beispielsweise aus der passiven Immunisierung gegen
25 Hepatitis A, Hepatitis B und der FSME verschiedene Impfschemata zur passiven Immunisierung
bekannt. Derartige Impfschemata können durch Routineversuche auf spezifische Viren wie zum
Beispiel HIV, den Katzenleukämievirus und andere adaptiert werden. Die Antikörper, die zur
passiven Immunisierung verwendet werden, können bevorzugt monoklonale Antikörper sein.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die erfindungsgemäßen
immunogenen Komponenten bzw. das erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel oder der erfin-
dungsgemäße Kit zur Diagnose, Prophylaxe, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder
Nachbehandlung von retroviralen Erkrankungen verwendet.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

5 **Beispiel**

1. Material und Methoden

1.1 Klonierung

10

Die rekombinanten gp41 Konstrukte wurden auf Basis des HIV-1 Moleklarklons pNL4-3 (NIH, #114) generiert. Mit spezifischen Primern (Sigma ARK) wurde der codierende Bereich für die Ectodomäne mittels PCR amplifiziert. Die codierenden Bereiche der Hybridkonstrukte (im Folgenden Hybrid I und II genannt), bestehend aus einem PERV-p15E-Ectodomänen-Rückgrat mit eingesetzten HIV-Epitopen, wurden mit Hilfe einer zweistufigen Mutagenese-PCR generiert (27). Der codierende Bereich für HybridII basiert auf dem von HybridI, er wurde lediglich auf beiden Seiten durch HIV-Sequenzen erweitert. Die codierenden Bereiche für Konstrukte, die aus den Epitopen E1 und E2 von gp41 (im Folgenden Loop I genannt) von HIV-1 bestehen und durch eine kurze Peptidbrücke verbunden sind, wurden durch Hybridisierung von 80mer

15

20

25

Oligonucleotiden (Sigma-ARK) und eine Auffüllreaktion mittels PCR generiert. Über eine BamHI-Schnittstelle am 5'Ende und eine XhoI-Schnittstelle am 3'Ende des codierenden Stranges wurde das PCR-Produkt in die Multiple Cloning Site des Expressionsvektors pCal-n (Stratagene) ligiert. Chemokompetente, codonoptimierte *E.coli* BL21 DE3 (Stratagene) wurden mit diesen Konstrukten transformiert.

30

Rekombinante CBP-Fusionsproteine

rgp41:

MGCTSMTLTVQARQLLSDIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLG
IWGCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHSLEESQNNQKEKNEQ
ELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK

35

Hybrid I (HIV-Sequenzen unterstrichen):

LITQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSVVVLQNRRLDLLFLKKEGLCVALKE
ECCFYVDHSGAIRDMSKLRERLERRRREELDKWASLWNWFN

5

Hybrid II (HIV-Sequenzen unterstrichen):

LITGASVTLTVQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSVVVLQNRRLDLLFLKKE
GLCVALKEECCFYVDHSGAIRDMSKLRERLERRRREELDKWASLWNWFNITNWLWY

10 Loop I: (HIV-Sequenzen unterstrichen):

LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSSSPSSNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL

Ektodomäne von p15E von FeLV (Aminosäure 476-583):

15 LETAQFRQLQMAMHTDIQALEESISALEKSLTSLSVVVLQNRRLDILFLQEGGLCAALKEECCFY
ADHTGLVRDNMAKLRERLKQRQQLFDSQQGWFEQWFKSPW

Primer:

rgp41 BamHI fw: cgc gga tcc atg ggc tgc acg tca atg acg ctg

20 rgp41 XhoI rev: cac ccg ata ctc gag ata cca cag cca att tgt tat g

Hybrid I BamHI fw: cgc cca tcc cta atc aca caa gcg aga cag ctg

Hybrid I XhoI rev: cac ccg ata ctc gag tca gtt gaa cca gtt cca aag

25

Hybrid I E1mut fw: caa gcg aga cag ctg agt gat att gtt cag caa caa cga att gta acg gaa gat ctc caa
gcc c

Hybrid I E1mut rev: ttg ttg ctg aac aat atc act cag cag ctg tct cgc ttg tgt gat tag gga tcc acg cgg

30

Hybrid I E2mut fw: gaa ctg gat aag tgg gcg tgc ctt tgg aac tgg ttc aac tga gaa ttc aga ctc cag ggg
tcg act cga gc

Hybrid I E2mut rev: gtt cca aag cca cgc cca ctt atc cag ttc ttc cct tcg acg cct ctc taa cct ttc tc

35

Hybrid II BamHI fw: cg gga tcc gga gca tca gta acg ctg acg gta cag cgg aga caa ta ttg tgt gat ata
g

Hybrid II XhoI rev: cg ctc gag cta ata cca cag cca att tct tat gtt aaa cca att cca caa act tgc cca tt

5

Loop I BamHI fw: ggg gat ccc agc ca ttg gag atg tcg aac cagttc cac aa gaa gcc cat ttg tcc agt tcc
agc agt tcc tgt tcg tta gaa gac gga gaa gaa gac a

Loop I XhoI rev: ccg gat ccc tgg gtg ctg ctg gtt cta cca tgg gtg ctg ctt ctg tta ccc tga ccg ttc agg ctc
gtc tgc tgc tgt ctt ctt ctc cgt ctt cta acg a

10

P15E FeLV fw:cgg gat ccc ttg aaa cag ccc agt tca gac aa

p15E FeLV rev:cgg aat tcc cag ggg gac ttg ttg aac cat cc

15

1.2 Expression der rekombinanten Proteine

Zur Expression wurde 1 l 37 °C warmes LB-Amp (LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin) mit 1 ml
Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 225rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von
0,5 wurden die Expressionskulturen durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) IPTG (Sigma)
für 4 h induziert (37 °C und 225rpm).

20

1.3 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Stratagene für die CBP-fusionierten
Proteine. Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot
Analyse unter Verwendung des monoklonalen gp41-spezifischen Antikörpers 2F5 bzw. eines
Serums gegen p15E von FeLV überprüft.

25

1.4 Synthetische Peptide und Biokonjugate

30

Synthetische Peptide, die den Sequenzen der Epitope E1 und E2 von HIV entsprechen (E1
(LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLS) und E2 (NEQELLELDKWASLWNWFDIT NWL), wurden
von der Firma Jerini hergestellt und mittels HPLC gereinigt. E1 und E2 wurden als freies Antigen
(in Kombination oder einzeln) oder an Dextran (MW 6 KDa, Sigma) eingesetzt. Die Herstellung

35

von Dextran-Peptid-Konjugaten erfolgte entweder über die direkte Bindung, der im aktiviertem Dextran enthaltenen Carboxylgruppen, an primäre Aminogruppen der Peptide (28) oder über einen heterobifunktionalen Crosslinker (3-(2-Pyridyldithio)-Propionyl-Hydrazid, PDPH, Pierce), der eine zielgerichtete Kopplung über die am C- bzw. N-terminalen Ende der Peptide angefügten Cysteine ermöglicht (29), überlappende synthetische Peptide, die dem gesamten Env (gp120 und gp41) von HIV entsprechen, wurden von NIH, USA (HIV-Env-Peptidset abgeleitet vom HIV-1 Isolat MN, Cat#6451) erhalten. Überlappende und immobilisierte Peptide, die dem gp41 bzw. dem p15E von FeLV entsprechen, wurden von Jerini hergestellt.

1.0 1.5 Immunisierung von Ratten, Ziegen und Mäusen

Wistar Ratten (BfR, weiblich 54-58 Tage alt), Ziegen, Balb/c-Mäuse (weiblich, 10-20 g) wurden mit 500µg-1mg Protein, Peptid oder Peptidkonjugat in 800µl PBS/Freund's inkompletten Aduvant-Gemisch (1:1) immunisiert, 200µl davon wurden i.m. in jeden Hinterlauf und 400µl s.c. im Nacken appliziert. Jeweils drei Tiere wurden mit demselben Antigen immunisiert. Die Tiere wurden nach 4 Wochen mit dem gleichen Injektionsschema und den gleichen Antigenen geboostert.

2.0 1.6 Serumgewinnung

Die Blutabnahme der Ratten und Mäuse erfolgte mittels retrobulbärer Punktion, das der Ziegen aus der Halsvene. Das Blut wurde nach 20 h Lagerung bei 4 °C durch Zentrifugation in Serum und zelluläre Bestandteile getrennt. Die im Serum enthaltenen Komplementfaktoren wurden durch 30 min Inkubation bei 56 °C inaktiviert. Das Serum wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.0 1.7 Epitopmapping

Das Epitopmapping erfolgte auf einer Pepspot-Membran (Jerini, Berlin), auf der um 11 Aminosäuren überlappende Peptide, die der Sequenz von gp41 und p15E von FeLV entsprechen, punktweise aufgetragen waren, nach Angaben des Herstellers.

1.8 ELISA

Zur Bestimmung der Veränderung der Avidität des mAb 2F5 wurden 50-100 ng Peptide des N-terminalen Bereichs der Ectodomäne von gp41 aus einem überlappend angeordneten HIV-Env-Peptidset jeweils in Kombination mit Dp178 oder Peptid P6373 auf Probind ELISA-Platten aufgebracht (NUNC). Der mAb 2F5 wurde in einer Verdünnung von 1:25000 in Anwesenheit von 0-8M Hamstoff 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels eines polyklonalen Ziegenanti-Human-Serums (1:2000) konjugiert an Meerettich-Peroxidase (Sigma). Gemessen wurde bei einer OD_{492/560}. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

10

1.9 Neutralisierungsassay

Um die Seren auf HIV-neutralisierende Wirkung zu testen, wurden 5x10⁴ C8166-Zellen (humane T-Zelllinie) in 100 µl RPMI-Medium auf 96well-Rundbodenplatten ausgesät. Dazu wurden 50 µl HIV-IIIB-Stock (entspricht einer TCID₅₀ von 2 x 10³) und 50 µl 1:4 mit Medium vorverdünntes Rattenserum gegeben. Die Platten wurden für 65 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert.

15

Der Medium-Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Durch Zugabe von Proteinase K (Invitrogen) in 100 µl 1xPCR-Puffer (Roche) und 3 h Inkubation bei 56 °C wurden störende Proteine von der genomischen DNA entfernt. Die Proteinase K wurde durch 30 min Inkubation bei 95 °C inaktiviert.

20

Auf Basis des Zelllysats wurde mit HIV-env-spezifischen Primern und einer env-spezifischen, Dabcyl-markierten Sonde (TIB MOLBIOL, Berlin) und PCR-Mastermix (Stratagene) eine Realtime-PCR durchgeführt. Die lineare serumspezifische Hemmung wurde über die Formel $2^{\Delta ct}$ ermittelt, wobei Δct die Differenz aus $ct(\text{Immunserum})$ und $ct(\text{Praeimmunserum})$ ist. Diese linearisierten Werte wurden dann in eine prozentuale Hemmung umgerechnet. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

25

Ein Virusstock des FeLV-A (Glasgow strain) wurde auf uninfizierten FEA-Zellen titriert, der Titer betrug 10^{4.76} TCID₅₀/ml. Für den Neutralisationstest wurden 6000 FEA-Zellen per well einer 96-well Microtiter-Platte ausgesät. Präimmunes and Immunsera wurden bei 56°C für 30 min hitzinaktiviert. 50µl Virus wurden zu 1:2 Verdünnungen des Serums or gereinigtem Immunoglobulin gegeben, bei 37°C für 30 min inkubiert und zu den Zellen addiert. Alternativ wurde die Serumkonzentration konstant bei 1:5 gehalten, und das Virus wurde verdünnt. Nach 3

30

35

Tagen wurden die Zellen aufgebrochen und lysiert (20 mg/ml Proteinase K in PCR buffer, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCL, pH 8.4). Die Zellen wurden bei 56°C für 3h inkubiert, danach noch 10 min bei 95°C um die Aktivität der Proteinase K zu inhibieren. Die Provirusintegration wurde mittels PCR quantitativ erfasst.

5

2. Ergebnisse

2.1 Epitopmapping des HIV-1 neutralisierenden monoklonalen Antikörpers 2F5

10

Der humane, monoklonale Antikörper (mAb) 2F5 weist ein breites Neutralisationsspektrum gegenüber Laborstämmen und verschiedenen Primärisolaten auf. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der Antikörper an eine lineare Sequenz (ELDKWA) innerhalb der Ectodomäne des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1 bindet. Diese Sequenz ist wenige Aminosäuren N-terminal des Transmembrandurchgangs lokalisiert. Mit Hilfe eines Epitopmappingverfahrens, basierend auf einer Pepspot Membran konnte diese Sequenz als Bindungsstelle für 2F5 bestätigt werden (Abb.3).

15

2.2 Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 an Dp178 und CBP-rgp41

20

In Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass der mAb 2F5 besser an die gesamte Ectodomäne von gp41 bindet als an das 34mer Peptid (Dp178), das das in der Literatur beschriebenen Epitop ELDKWA beinhaltet (Abb.4).

2.3 ELISA mit 2F5 auf überlappenden Peptiden der Ectodomäne von gp41 in Kombination mit Dp178

25

Um festzustellen, ob das vollständige Epitop von 2F5 einen weiteren Anteil im Bereich der Ectodomäne von gp41 besitzt, wurden überlappende 15mere, die die gesamte Ectodomäne abdecken, in Kombination mit Dp178 auf ELISA-Platten aufgebracht. 2F5 wurde auf diesen Peptidkombinationen in verschiedenen Konzentrationen Harnstoff inkubiert (Abb. 5). Nur das Peptid P6342 bewirkt eine synergistische Steigerung der Bindung von 2F5 an Dp178. Die Verstärkung der Bindung bei hohen Konzentration von Harnstoff bei gleichzeitiger Applikation beider Domänen des erfindungsgemäßen immunogenen Konstruktes ist die Grundlage für einen Schelltest zum Nachweis neutralisierender Antikörper mit Hilfe eine ELISAs.

30

35

2.4 Bindung von 2F5 an P6373 und verschiedene vom Peptid 6342 abgeleitete Peptide mit Aminosäureaustauschen

Um zu testen, inwieweit Aminosäureaustausche im Peptid P6342 die gesteigerte Bindung von 2F5 an die Sequenz ELDKWA beeinflussen, wurde das Peptid P6373 (NEQELLELDKWASLW) mit abgewandelten Peptiden (P6342 mit 1-5) auf ELISA-Platten aufgebracht und bei einer Konzentration von 3M Harnstoff mit 2F5 inkubiert. Abb. 6 zeigt die Auswertung des ELISA nach Abzug der Absorption von 2F5 an P6373 allein. Dabei zeigte sich, dass Aminosäureaustausche in mindestens 4 Positionen des Peptids P6342 die Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 verringern.

2.5 Stöchiometrie der Peptide P6342 und P6373 bei der Bindung des mAb 2F5

Um zu überprüfen, unter welchen stöchiometrischen Verhältnissen die gesteigerte Bindung von 2F5 an das Peptid P6373 und P6342 beeinflusst wird, wurden unterschiedliche stöchiometrische Verhältnisse von P6342 und P6373 im ELISA aufgebracht und mit 2F5 unter steigenden Harnstoffkonzentrationen inkubiert (Abb.7).

Dabei wurde gezeigt, dass ein 2 : 1 Verhältnis von P6342 zu P6373 eine deutlich gesteigerte Bindung von 2F5 an ELDKWA bewirkt als ein Verhältnis von 1 : 1, was impliziert, dass ELDKWA durch zwei P6342 Peptide besser stabilisiert wird als durch eins.

2.6 Hemmung der 2F5-vermittelten Virusneutralisation durch die Peptide E1 und E2

Im Neutralisierungsassay hemmt die Kombination aus E1 und E2 (auf 25mM verlängerte Versionen von P6342 und P6373) die virusneutralisierende Wirkung von 2F5 besser als E2 alleine (Abb.8A).

Darüber hinaus zeigt auch ein stöchiometrisches Verhältnis von 2 : 1 (E1/E2) eine stärkere Hemmung der neutralisierenden Aktivität von 2F5 als ein Verhältnis von 1 : 1, ähnlich wie im ELISA (Abb.8B).

Diese Daten untermauern die ELISA-Experimente, in denen gezeigt wurde, dass die von 2F5 erkannte Sequenz ELDKWA durch zwei N-terminale Sequenzen der Ectodomäne von gp41

besser stabilisiert wird als nur durch eine und zeigt, dass diese Konformation auch wichtig ist für die Hemmung der Neutralisation.

2.7 Immunisierungsversuche mit rekombinanten Antigenen und synthetischen Peptiden

5

2.7.1 Gewinnung und Charakterisierung von rekombinantem gp41

Die auf der Basis des NIH-HIV-Moleklarklons pNL4-3 mit den spezifischen Primern 1 und 2 in der PCR amplifizierte Sequenz von gp41 wurde über die Restriktionsschnittstellen von BamHI und XhoI in den über die gleichen Restriktionsenzyme geöffneten Vektor pCal-n (Stratagene) ligiert. Der geschlossene Vektor (pCal-n rgp41) wurde in BL21 Codon Plus (Stratagene) transformiert und dort IPTG abhängig exprimiert. Die Aminosäuresequenz des produzierten Fusionsproteins ist unter Abschnitt 2.1 aufgelistet. Es gelang, diese Sequenz als rekombinantes Fusionsprotein zu exprimieren. Allerdings war das Fusionsprotein nicht löslich und wurde deshalb als Aggregat nach 8M Harnstoffpräzipitation zur Entfernung der löslichen bakteriellen Proteine verwendet.

15

2.7.2 Gewinnung und Charakterisierung von rekombinanten Hybridkonstrukten bestehend aus einem PERV-Transmembranprotein-Rückgrat mit eingesetzten HIV-Epitopen

20

Ausgehend vom Vektor pCal-n rp15E, der die Sequenz der Ectodomaine des transmembranen Hüllproteins p15E des porcinen endogene Retrovirus PERV-A enthält (26), wurden mit spezifischen Primern Sequenzen von gp41 von HIV-1 in die PERV-p15E Sequenz eingefügt und dadurch die entsprechenden Domänen von p15E eliminiert (Substitution). Dazu wurden zwei verschiedene Sequenzen von gp41 eingefügt, am N-terminalen Ende und am C-terminalen Ende. Außerdem wurden die jeweilige Substitute in zwei verschiedenen Längen verwendet (Hybrid I und Hybrid II). Die entstandenen PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen von BamHI und XhoI in den über die gleichen Restriktionsenzyme geöffneten Vektor pCal-n (Stratagene) ligiert. Der geschlossene Vektor (pCal-n rgp41) wurde in BL21 Codon Plus (Stratagene) transformiert und dort IPTG abhängig exprimiert. Die Aminosäuresequenz der viralen Anteile (p15E und gp41) der produzierten Fusionsproteine Hybrid I und II sind in Abschnitt 2.1 aufgelistet. Auch diese Fusionsproteine waren nicht löslich und wurden deshalb als Aggregat nach 8M Harnstoffpräzipitation zur Entfernung der löslichen bakteriellen Proteine verwendet.

25

30

2.7.3 Gewinnung und Charakterisierung von rekombinanten E1-E2 Konstrukten verbunden über eine Peptidbrücke

5 Durch Hybridisierung von Oligonucleotiden mit anschließender PCR-Auffüllreaktion wurden die codierenden Sequenzen für das Peptid E1 und E2 verbunden durch den codierenden Bereich für eine fünf Aminosäuren lange Peptidbrücke hergestellt. Das entstandene PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen von BamHI und XhoI in den über die gleichen Restriktionsenzyme geöffneten Vektor pCal-n (Stratagene) ligiert. Der geschlossene Vektor (pCal-n rgp41) wurde in BL21 Codon Plus (Stratagene) transformiert und dort IPTG abhängig
10 exprimiert. Die Aminosäuresequenz des produzierten Fusionsproteins Loop 1 ist in Abschnitt 2.1 aufgelistet. Auch diese Fusionsproteine waren nicht löslich und wurden deshalb als Aggregat nach 8M Harnstoffpräzipitation zur Entfernung der löslichen bakteriellen Proteine verwendet.

2.7.4 Immunisierung von Ratten und Analyse der Immunseren

15 Ratten in Gruppen von mindestens je drei Tieren wurden mit den gereinigten rekombinanten Proteinen, aber auch mit den synthetischen Peptiden, die den Domänen E1 und E2 des gp41 von HIV-1 entsprechen, immunisiert und geboostert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Immunseren wurden im Western blot und im ELISA auf bindende Antikörper gegen gp41
20 untersucht. Die Seren wurden weiterhin im Neutralisationsassay auf neutralisierende Antikörper untersucht.

Um die Rattenserum auf virusneutralisierenden Eigenschaften zu testen, wurden 5×10^4 C8166 mit 2×10^3 TCID₅₀ HIVIIB in Anwesenheit der Rattenserum infiziert. Abb. 9 zeigt die prozentuale
25 Hemmung der Virusinfektion umgerechnet aus dem Δ ct der hemmenden Wirkung von Praeimmun- und Boosterserum. Als Positivkontrolle wurde die Infektion bei 2,5µg/ml 2F5 durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 1 zusammengefasst. Obwohl alle Seren im ELISA
30 und Western blot mit gp41 reagierten, waren nur Seren von einigen Tieren, die entweder beide Peptide E1 und E1 in Kombination (Tiere Q2-4), nicht aber einzeln (Tiere), von Tieren, die die Peptide in Kombination (E1 und E2) an Dextran 6000 direkt gekoppelt (Tiere R1, R2), von Tieren, die die Peptide in Kombination (E1 und E2) an Dextran 6000 mittels eines Linkers gekoppelt (Tiere S1-3) und von Tieren, die das Hybrid I und das Hybrid II (p15E von PERV mit

substituierten E1 und E2 Domänen unterschiedlicher Länge) (Q4, P2-4, Q1 und U2-3) appliziert bekamen, virusneutralisierend.

5 Besonders die Ratten O4 und P4, beide immunisiert mit Hybrid II, und Q3 und S3, immunisiert mit E1 und E2 Peptiden (frei oder an Dextran gebunden), zeigen bei einer Verdünnung von 1:16 ähnlich gute neutralisierende Eigenschaften wie 2,5 µg/ml mAb 2F5.

Das rekombinante gP41, das eigentlich als Antigen für die Immunisierung nicht geeignet ist, da es unlöslich vorliegt, war nicht in der Lage, neutralisierende Antikörper hervorzurufen (Gruppe N).

10

Diese Ergebnisse zeigen, im Falle von HIV auf unlängst erhobene Befunde, die zeigten, dass nach der Immunisierung der rekombinanten Ectodomäne von p15E von PERV (30) neutralisierende Antikörper induziert werden konnten, nicht zurückgegriffen werden kann. Das entsprechende Antigen war zum einen nicht löslich, zum anderen induzierte es, selbst als
15 unlösliches Aggregat für die Immunisierung verwendet, keine neutralisierenden Antikörper. Die Unfähigkeit neutralisierende Antikörper zu induzieren, kann nicht nur auf die Unlöslichkeit zurückgeführt werden, da in einer parallelen Studie, in der durch entsprechende Fusionsproteine eine Löslichkeit induziert wurde, auch keine neutralisierenden Antikörper hervorgerufen wurden (Daten nicht gezeigt). Hinzu kommt, dass das Hybrid II (p15E von PERV mit substituierten E1
20 und E2 Domänen der längeren Variante) auch nicht löslich war, aber neutralisierende Antikörper hervorrief.

Tabelle 1:

Tiere	Zahl der immunisierten Ratten	Für die Immunisierung und das Boostern verwendete Antigene	Zahl der Tiere mit neutralisierenden Seren/Zahl der immunisierten Tiere ($\Delta C_t > 2$)
N1-4	4	CBPrgp41	0/4
O4, P1-4, Q1	6	Hybrid II	3/6
Q2-4	3	E1/E2 freie Peptide	2/3
R1, R2	2	E1/E2-Dextran 6-Konjugate	1/2
S1-3	3	E1/E2-PDPH*-Dextran6-Konjugate	1/3
S4, T1-2	3	E1 freies Peptid	0/3
T3,4, U1	3	E2 freies Peptid	0/3
U2-4	3	Hybrid I	2/2
V1-4, W1-2	6	Loop I	n.t.**

* 3-(2-Pyridyldithio) Propionyl Hydrazid, ** nicht getestet

Legenden:**Abb. 1 Raumstruktur von gp41 mit dem darüber liegenden gp120**

5 (Zwick et al. 2001 (5)).

Abb. 2 A) Schema der Ectodomäne von gp41: Vereinfachte Darstellung von monomerem gp41. Hervorgehoben sind das Fusionpeptid am N-Terminus, die N-terminale Helix-Region (NHR), der Cystein-Cystein-Loop, die C-terminale Helix-Region (CHR) und der Transmembran-
10 durchgang.

B) Hexamer gp41: Dargestellt sind die NHR und CHR in der Aufsicht. Drei N-Helices sind als Trimer bestehend aus drei parallelen α -Helices mit drei außen liegenden antiparallel angeordneten C-Helices. Die wechselwirkenden Aminosäuren zwischen den Helices sind
15 eingetragen.

C) Klappmechanismus von gp41 bei der Infektion. Gp210 gibt nach der Bindung von CD4 und Korezeptor (CCR5/CXCR4) das darunter liegende gp41 frei. Dieses dringt mit dem Fusionspeptid in die Wirtszellmembran ein. Durch hydrophobe Wechselwirkung klappen die NHR und die
20 CHR zusammen und ziehen dabei die Wirtszellmembran und die Virusmembran zueinander, was zur Fusion beider Membranen führt.

Abb. 3 Epitopmapping für den mAb 2F5 mittels Pepspot Membran: 13mere Peptide wurden über einen Acetyl-Linker an eine Nitrozellulosemembran kovalent gebunden. Von Spot zu Spot
25 überlappen diese Peptide um 11 Aminosäuren und decken dabei die gesamte Sequenz des gp41 ab. Der mAb 2F5 wurde in einer Konzentration von 250 ng/ml eingesetzt. Das Sekundärantikörperkonjugat (anti-human-POD) wurde 1:5000 eingesetzt. Das Epitop in der Sequenz von gp41 ist unterstrichen.

Abb. 4 SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) von Dp178 (Spur 1) und rekombinant exprimiertem CBP-rgp41 (Spur 2): Obwohl mehr Dp178, das der C-Helix der Ectodomäne des gp41 entspricht, aufgetragen wurde, wird es schlechter im Western Blot detektiert als das rekombinante CBP-rgp41, das die gesamte Ectodomäne des gp41 beinhaltet. 2F5 wurde im
30 Western Blot in einer Konzentration von 500ng/ml eingesetzt.

35

Abb. 5 ELISA-Untersuchungen zur Bindung des mAb 2F5 mit Dp178 in Kombination mit überlappenden Peptiden der Ectodomäne von gp41: Das NIH Peptidset besteht aus 15meren Peptiden, die jeweils um 11 Aminosäuren überlappen und die die gesamte Proteinsequenz des Hüllproteinkomplexes umfassen. Es wurden alle Peptide in Kombination mit Dp178 getestet, hier sind nur die Ergebnisse für 10 Peptide aus dem N-terminalen Bereich der Ectodomäne von gp41 gezeigt. **(A)** Das Peptid P6342, aber nicht alle anderen, steigert die Bindung von 2F5 an Dp178. Die Steigerung der 2F5 Bindung erfolgt synergistisch, da der mAb 2F5 das P6342 alleine nicht erkennt, und ist auch noch bei 3M und 5M Harnstoff zu erkennen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus Triplikaten. **(B)** Sequenz der eingesetzten Peptide. DP107 entspricht der N-Helix der Ectodomäne von gp41 und wurde als Kontrolle mitgeführt.

Abb. 6 Einfluss von Aminosäureaustauschen im Peptid P6342 auf die gesteigerte Bindung von 2F5 an P6373: In der Sequenz von P6342 wurden je zwei aufeinanderfolgende Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Dabei haben sich besonders die Austausche im C-terminalen Bereich (P6342 mut4 und mut5) als entscheidend schlechter in der synergistischen Steigerung der Bindung von 2F5 an P6373 gezeigt.

P6342: AASVTLTVQARLLLLS
 P6342 mut1: AAAATLTVQARLLLLS
 P6342 mut2: AASVAATVQARLLLLS
 P6342 mut3: AASVTLAAQARLLLLS
 P6342 mut4: AASVTLTVAARLLLLS
 P6342 mut5: AASVTLTVQAAALLS

Abb. 7 ELISA mit variierenden stöchiometrischen Kombinationen P6342/P6343 bei vier verschiedenen Konzentrationen Harnstoff: Der ELISA zeigt, dass 2F5 besonders gut an ein 2:1 Verhältnis von P6342/P6373 bindet. Ein größerer Überschuss von P6342 bedeutet keine Steigerung der Bindung, während ein 1:1 Verhältnis eine deutlich schwächere Bindung des mAb 2F5 an die beiden Peptide bewirkt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte aus Triplikaten.

Abb. 8 Realtime PCR, (A) Inhibierung der 2F5-abhängigen Virusneutralisation durch die Peptide E1 und E2.

Die Grafik zeigt die ct-Werte bei der Verwendung von Zelllysate nach Behandlung mit unterschiedlichen Mengen E1 (LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLLS) und E2

(NEQELLELDKWASLWNWFDIT: NWL) während der Infektion mit HIV. 2F5 wurde in einer Konzentration von 2,5 µg/ml eingesetzt.

(B) Auch im Neutralisierungsassay wirkt ein stöchiometrisches Verhältnis von 2:1 E1/E2 stärker hemmend auf die virusneutralisierende Wirkung als ein 1:1 Verhältnis. Alle Werte wurden als
5 Triplikate gemessen.

Abb. 9 HIV-Neutralisierung durch Rattenserum: Die Säulen zeigen die prozentuale Hemmung der HIV-1 IIIB Provirusintegration in C8166 in Anwesenheit von verschiedenen Rattenserum bzw. 2F5. Die Rattenserum wurden 1:4 vorverdünnt. 2F5 wurde in einer Konzentration von 2,5 µg/ml
10 eingesetzt. Die Umrechnung der ct-Werte in prozentuale Hemmung ist unter 2.9 beschrieben.

Abb. 10 Rekombinante von gp41 abgeleitete Konstrukte: (A): Von gp41 von HIV-1 wurde ein rekombinantes protein abgeleitet, das nur noch Teile der Exodomäne enthält. (B) Vom transmembranen Hüllprotein p15E des porcinen endogenen Retrovirus wurde ein rekombinantes
15 Protein abgeleitet und in dieses Protein wurden an topographisch identischen Positionen die E1 und E2 Domänen von gp41 (grau) von HIV-1 eingesetzt (Substitution der entsprechenden Epitope von p15E). Verschieden große E1 und E2 Domänen wurden gewählt.

**Abb. 11 Rekombinantes von gp41 abgeleitetes Loop-Protein und freie Peptide sowie
20 Konjugate an ein Trägermolekül**
Die grau gezeichneten E1 und E2 Domänen wurden (A) als rekombinantes Protein mit einem Aminosäurelinker bzw. (B) als freie synthetische Peptide oder gekoppelt an das Trägermaterial Dextran hergestellt.

Abb. 12 Neutralisierende Antikörper nach Immunisierung mit der rekombinanten Ektodomäne von p15E von FeLV
25 Ziege 27 wurde mit der rekombinanten Ektodomäne immunisiert, das Antiserum hemmte die Infektion von FEA-Zellen mit dem feline Leukämievirus FeLV. Die Infektion wurde mittels PCR (Nachweis der Provirus-Infektion gemessen). (A) Titration des Virus mit präimmunem Serum, (B)
30 Titration des Virus mit Immunserum.

Abb. 13 Epitopmapping von FeLV-neutralisierenden Seren
Ziegeserum 27, 10 Rattenserum und affinitäts-chromatographisch gereinigte Antikörper nach Immunisierung mit der rekombinanten Ektodomäne von p15 von FeLV wurden kartiert wie in Abb.
35 3 beschrieben. Überlappende Peptide, die der Ektodomäne von p15 von FeLV entsprechen,

wurden verwendet. IgG: Prot G-gereinigte Antikörper, p15E - p15E-gereinigte Antikörper. Die vier wichtigsten Epitop-Domänen sind eingerahmt.

Abb. 14 Effekt der gemeinsamen Immunisierung mit dem rekombinanten Protein p15E von FeLV und dem kommerziellen Anti-FeLV-Impfstoff Leucogen

5 Ratten wurden immunisiert mit dem kommerziellen Impfstoff Leucogen (Tiere 56.1, 56.2, 56.3) oder mit dem kommerziellen Impfstoff Leucogen und dem rekombinanten Protein p15E von FeLV. Die Neutralisation wurde mittels quantitativer real time PCR gemessen und als Prozent der Provirus-Integration dargestellt. Es ist deutlich, dass Seren der Gruppe 54 FeLV (Leucogen und
10 p15E) neutralisieren als Seren der Gruppe 56 (Leucogen) allein.

Literatur:

1. UNAIDS Statistik 2002
- 5 2 Stover, J., et al., The Lancet, 2002, 360, 73-77
3. McMichael A.J., et al., Nature, 2003, 9, 874-880
4. Check, E., Nature, 2003, 423, 912-14
5. Zwick, M.B.; et al., JVirol, 2001, 75, 10892-10905
6. Turner, B., et al., JMolBiol, 1999, 285, 1-32
- 10 7. Weissenhom, W., et al., Nature, 1997, 387, 426-430
8. Evans D. T., et al., Imm Rev, 2001, 183, 141-158
9. Wild, C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89, 10537-19541
10. Wild, C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91, 9770-9774
11. Denner et al., AIDS, 1994, 8, 1063-1072
- 15 12. Poveda, E., et al., AIDS, 2002, 16, 1959-1963
13. Chan D.C., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95, 15613-15617
14. Muster, T., et al., J Virol, 1993, 67, 6642-6647
15. Muster T, et al., J Virol. 1994, 68, 4031-4034
16. Conley AJ, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91, 3348-3352
- 20 17. Ferrantelli F, et al., AIDS. 2003, 17, 301-309
18. Stiegler G, et al., AIDS, 2002, 16, 2019-2025
19. Armbruster C, et al., AIDS, 2002, 16, 227-233
20. Xiao, X., et al., Int Arch Allergy Immunol, 2000, 122, 287-292
21. Joyce, J.G., et al., J Biol Chem, 2002, 277, 45811-45820
- 25 22. Ho, J., et al., Vaccine, 2002, 20, 1169-1180
23. Marusic C., et al., J Virol, 2001, 75, 8434-8439
24. Beneduce, F., et al., Antiviral Res, 2002, 55, 369-377
25. Parker, C.E., et al., J Virol, 2001, 75, 10906-10911
26. Zwick, M.B., et al., J.Virol, 2001, 75, 12198-12208
- 30 27. Lottspeich F., Zorbas H.: Bioanalytik, Spektrum Akad. Verl., 1998, S. 688ff
28. Bocher M. et al., J Immunol Methods. 1997 208, 191-202.
29. Hermanson G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, p. 252
30. Fiebig et al., Virology, 2003, 307, 406-413

Patentansprüche

1. Immunogenes Konstrukt umfassend Aminosäuresequenzen ausgewählt aus einem viralen
5 transmembranen Hüllprotein, das mindestens über einen Membrandurchgang mit der
Virusmembran assoziiert ist, mindestens eine Fusionsdomäne und mindestens zwei alpha-
helikale Strukturen umfasst,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Aminosäuresequenzen ausgewählt sind
- 10 (i) aus einem ersten Bereich des Hüllproteins, lokalisiert zwischen dem
Membrandurchgang und einer ersten alpha-helikalen Struktur sowie
- (ii) aus einem zweiten Bereich, lokalisiert zwischen der Fusionsdomäne und einer
zweiten alpha-helikalen Struktur
- und/oder
- 15 das Konstrukt, die die jeweilige Aminosäuresequenzen codierende DNA umfasst.
2. Immunogenes Konstrukt nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
- 20 die ausgewählten Aminosäuresequenzen ein synthetisches Peptid, ein rekombinantes
Protein, eine durch eine korrespondierende DNA codierende Sequenz für die jeweilige
Aminosäuresequenz und/oder eine Kombination dieser sind.
- 25 3. Immunogenes Konstrukt nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
die erste alpha-helikale Struktur eine C-terminale Helix und die zweite alpha-helikale
Struktur eine N-terminale Helix des Hüllproteins ist.
- 30 4. Immunogenes Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet, dass

es sich bei dem Hüllprotein um dasjenige eines Virus ausgewählt aus der Gruppe BIV, CEAV, EIAV1, FIV, OMVV, SIVmac, SIVcpz, VILV, HIV-1, HIV-2, RSV, ALV, JSRV, SRV, GALV, MLV, FeLV, BLV, HTLV-1, HTLV-2, KoRV, SARS-Virus und/oder HPV-1 handelt.

5

5. Immunogenes Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 4,

dadurch gekennzeichnet, dass

das Hüllprotein GP2, gp20, gp21, gp30, gp36, gp37, gp40, gp41, gp45, gp160, p15E, E2, HA2 und/oder F2 ist.

10

6. Immunogenes Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 5,

dadurch gekennzeichnet, dass

die mindestens zwei Aminosäuresequenzen ausgewählt sind aus der Gruppe der N-terminalen und der C-terminalen Sequenzen mindestens umfassend eine Sequenz gemäß No 1 bis No 104 und/oder die sie codierende DNA.

15

- 20 7. Immunogenes Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 6,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Aminosäuresequenzen untereinander und/oder die diese codierende DNA verbunden oder assoziiert sind.

25

8. Immunogenes Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Aminosäuresequenzen und/oder die diese codierende DNA mit Liposomen assoziiert sind, insbesondere eingeschlossen und/oder auf einer Liposomenmembran verankert sind.

30

9. Pharmazeutisches Mittel umfassend mindestens eines der immunogenen Konstrukte nach einem der Ansprüche 1 bis 8, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfsstoffen.
- 5
10. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 9,
zur Verwendung als Immuntherapeutikum oder –prophylaktikum.
- 10
11. Pharmazeutisches Mittel nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet, dass
es wenigstens eine weitere immunogene Komponente desselben Virus oder anderer Pathogene umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bordetella, Haemophilus, Borrelia, Pseudomonas, Corynebakterien, Mycobakterien, Streptokokken,
15 Salmonellen, Pneumokokken, Staphylokokken und/oder Clostridien.
12. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
20 es Zytokine oder deren DNA umfasst, insbesondere Interleukin-2, 4, 12 und/oder GM-CSF.
13. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, dass
25 mindestens eine Aminosäuresequenz an ein Trägersystem geknüpft ist.
14. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, dass
30 die Hilfsstoffe oder das Trägersystem aus einem oder mehreren Proteinfragmenten bestehen, die durch eine Peptidbindung an das äußere N- oder C-terminale Ende der Aminosäuresequenz geknüpft sind.

15. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Hilfsstoffe oder das Trägersystem ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend
Albumine, KLH und/oder Dextrane.
16. Pharmazeutisches Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 15,
dadurch gekennzeichnet, dass
es darüber hinaus mindestens ein nicht-spezifisches Immunadjuvanz umfasst.
17. Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID
No 1 bis No 104 und/oder die sie codierende DNA zur Verwendung in der Medizin.
18. Neutralisierender Antikörper, hergestellt durch Immunisierung mit dem immunogenen
Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
19. Kit zum Nachweis von Antikörpern umfassend das immunogene Konstrukt nach einem der
Ansprüche 1 bis 8 zur Diagnose, Verlaufs- und/oder Therapiekontrolle viraler
Erkrankungen.
20. Kit zum Nachweis von Virusantigenen umfassend einen neutralisierenden Antikörper nach
Anspruch 18 zur Diagnose, Verlaufs- und/oder Therapiekontrolle viraler Erkrankungen.
21. Verfahren zur Induktion einer Antikörperantwort,
dadurch gekennzeichnet, dass

das immunogene Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder das pharmazeutische Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 16 mit einem Organismus in Kontakt gebracht werden.

5

22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet, dass
das In-Kontakt-Bringen oral, anal, rektal, vaginal, intravenös, intradermal, subkutan und/oder intramuskulär durchgeführt wird.

10

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Induktion einer Antikörperantwort prophylaktisch oder therapeutisch erfolgt.

15

24. Verfahren nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Antikörper nach Anspruch 18 zur Therapie einer viralen Erkrankung, insbesondere einer retroviralen Erkrankung, bevorzugt HIV eingesetzt werden.

20

25. Verwendung des immunogenen Konstruktes nach einem der Ansprüche 1 bis 8, des pharmazeutischen Mittels nach einem der Ansprüche 9 bis 16, mindestens einer Aminosäuresequenz nach Anspruch 17 und/oder des neutralisierenden Antikörpers nach Anspruch 18 zur Diagnose, Prophylaxe, Therapie und/oder Verlaufskontrolle von viralen Erkrankungen, insbesondere retroviralen Erkrankungen.

25

- 30 26. Verwendung des Kits nach Anspruch 19 oder 20
zur Diagnose und/oder Verlaufskontrolle von viralen Erkrankungen, insbesondere retroviralen Erkrankungen.

27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26,
dadurch gekennzeichnet, dass
die virale Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend BIV, CEAV, EIAV1, FIV,
OMVV, SIVmac, SIVcpz, VILV, HIV-1, HIV-2, RSV, ALV, JSRV, SRV, GALV, MLV, FeLV,
BLV, HTLV-1, HTLV-2, KoRV, SARS-Virus und/oder HPV-1.
28. Verwendung des immunogenen Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-8 in einem
Neutralisationsassay.
29. Verfahren zur Generierung eines Antikörpers gegen eine retrovirale Erkrankung,
dadurch gekennzeichnet, dass
ein Organismus mit dem immunogenen Konstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dem
pharmazeutischen Mittel nach einem der Ansprüche 9 bis 16, mindestens einer
Aminosäuresequenz nach Anspruch 17 und/oder dem neutralisierenden Antikörper nach
Anspruch 18 in Kontakt gebracht werden und so eine humorale Immunantwort durch die
Bildung von Antikörpern induziert wird und anschließend die Antikörper aus dem
Organismus gewonnen werden.
30. Verfahren zur passiven Immunisierung eines Organismus,
dadurch gekennzeichnet, dass
die nach dem Verfahren nach Anspruch 29 gewonnenen Antikörper mit einem Organismus
in Kontakt gebracht werden.
31. Immunoassay für den Nachweis von BIV-, CEAV-, EIAV1-, FIV-, OMVV-, SIVmac-,
SIVcpz-, VILV-, HIV-1-, HIV-2-, RSV-, ALV-, JSRV-, SRV-, GALV-, MLV-, FeLV-, BLV-,
HTLV-1-, HTLV-2-, KoRV, SARS-Virus- und/oder HPV-1-Antikörpern in einer biologischen
Probe umfassend

- 5
- a) Beschichten einer festen Phase mit dem immunogenen Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8;
 - b) Inkubieren der festen Phase mit der biologischen Probe;
 - c) Inkubieren der festen Phase mit einem anti-humanen Antikörper, der die Klassen IgA, IgM, IgG nachweisen kann, der mit einer nachweisbaren Kennzeichnung markiert ist
- und
- d) Nachweis der Kennzeichnung, um die Anwesenheit der bindenden Antikörper gegen die genannten Viren in der Probe zu bestimmen.
- 10

32. Immunoassay für den Nachweis von Virusantigenen in einer biologischen Probe umfassend

- 15
- a) Beschichten einer festen Phase mit dem neutralisierenden Antikörper gemäß Anspruch 18;
 - b) Inkubieren der festen Phase mit der biologischen Probe,
 - c) Inkubieren der festen Phase mit einem zweiten, unterschiedlichen vom ersten, Antikörper gegen die gesuchten viralen Antigene, der in einem Tier oder einem Menschen nach Immunisierung mit dem immunogenen Konstrukt nach einem
- 20
- der Ansprüche 1 bis 8 gewonnen wurden
- und
- d) Nachweis des gekoppelten zweiten Antikörpers, um so die Menge des gebundenen Antigens zu bestimmen.

Referenzliste für die Aminosäuresequenzen

- SEQ ID No 1 QARQLLSDIVQQQ,
 SEQ ID No 2 ELDKWASLWNWFN,
 5 SEQ ID No 3 GASVTLTVQARQLLSDIVQQQ,
 SEQ ID No 4 ELDKWASLWNWFNITNWLWY,
 SEQ ID No 5 LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLS,
 SEQ ID No 6 NEQELLELDKWASLWNWFDITNWL,
 SEQ ID No 7 FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS,
 10 SEQ ID No 8 FLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLS,
 SEQ ID No 9 FLGFLGAAGSTMGAASLTTLTVQARQLLS,
 SEQ ID No 10 LLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS,
 SEQ ID No 11 FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQVRQLLS,
 SEQ ID No 12 FLGVLSAAGSTMGAAATALTVQHTLMK,
 15 SEQ ID No 13 NEQDLLALDKWASLWNWFDITNWLWYIK,
 SEQ ID No 14 NEQDLLALDKWANLWNWFDISNWLWYIK,
 SEQ ID No 15 NEQDLLALDKWANLWNWFDITNWLWYIR,
 SEQ ID No 16 NEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK,
 SEQ ID No 17 NEKDLLALDSWQNLWNWFDITNWLWYIK,
 20 SEQ ID No 18 NEQELLELDKWASLWNWFSITQWLWYIK,
 SEQ ID No 19 NEQELLALDKWASLWNWFDISNWLWYIK,
 SEQ ID No 20 NEQDLLALDKWDNLWSWFSITNWLWYIK,
 SEQ ID No 21 NEQDLLALDKWASLWNWFDITKWLWYIK,
 SEQ ID No 22 NEQDLLALDKWASLWNWFSITNWLWYIK,
 25 SEQ ID No 23 NEKKLELDEWASIWNWLDITKWLWYIK,
 SEQ ID No 24 AVGLAIFLLVLAIMAITSSLVAATTLVNQHHTAKV,
 SEQ ID No 25 SLSDTQDTFGLETSIFDHLVQLFDWTSWKDWIK,
 SEQ ID No 26 GVGLVIMLVIMAIVAAAGASLGVANAIQQSYTKAAVQTLAN,
 SEQ ID No 27 AMTQLAEEQARRIPEVWESLKDVFDWSGWFSWLKYI,
 30 SEQ ID No 28 FGISAIVAAIVAATAIARSATMSYVALTEVNKIMEVQNH,
 SEQ ID No 29 LAQSMITFNTPDIAQFGKDLWSHIGNWIPGLGASIIKY,
 SEQ ID No 30 SSSYSGTKMACPSNRGILRNWYNPVAGLRQSLEQYQVVKQPDYLLVPE,
 SEQ ID No 31 MDIEQNNVQKGIGIQQLQKWEDWVRWIGNIPQYLK,
 SEQ ID No 32 GIGLVIVLAIMAIIAAAGAGLGVANAVQQSSYTRTAVQSLANATAAQQN,
 35 SEQ ID No 33 QVQIAQRDAQRIPDVWKALQEAFDWSGWFSWLKYIPW,

- SEQ ID No 34 LGFLGFLATAGSAMGAASLVTAQSRTLLAVIVQQQQQLLDVV,
 SEQ ID No 35 EEAQIQQEKNMYELWKLNNWVDFGNWFDLT SWDLTSWIKY,
 SEQ ID No 36 LGALGFLGAAGSTMGAAAVTLTVQARQLLSGIVQQQNNLL,
 SEQ ID No 37 EEAQSQQEKNERDLELDQWASLWNWFDITKWLWYIK,
 5 SEQ ID No 38 GIGLVIVLAIMAIIAAAGAGLGVANAVQQSYTRTAVGSLANATAAQQE,
 SEQ ID No 39 EAALQVHIAQRDARRIPDAWKAIQEFNNWSSWFSWLKY,
 SEQ ID No 40 LGFLGFLATAGSAMGARSLTSAQSRTLLAGIVQQQQQLL
 SEQ ID No 41 EEAQIQQEKNMYELQKLNSWDILGNWFDLISWVKYIQ,
 SEQ ID No 42 WGPTARIFASILAPGVAAAQALREIERLACWSVKQANLTTSL,
 10 SEQ ID No 43 KFQLMKKHVNKIGVSDPIGWSWLRGIFGGIGEWAVH,
 SEQ ID No 44 SVSHLSSDCNDEVQLWSVTARIFASFFAOGVAAQALKEIERLA,
 SEQ ID No 45 ALQAMKEHTEKIRVEDDOIGDWFTRTFGGLGGWLAK,
 SEQ ID No 46 GLSLIILGIVSLITLIATAVTACCSLAQSIQAAHTVDLSSQNVTKVMGT,
 SEQ ID No 47 IENSPKATLNIADTVDNFLQNLFNFPSLHSLNCTL,
 15 SEQ ID No 48 AVTLIPLLVLGVSTAVATGTAGLGVAVQSYTKLSHQLINDVQALSSTI,
 SEQ ID No 49 KIKNLQEDLEKRRKALADNLFLTGLNGLLPYLLP,
 SEQ ID No 50 AIQFIPLVIGLGITTAVSTGTAGLGVSLTWYTKLSHQLISDBQAISSTI,
 SEQ ID No 51 KIKNLQDDLEKRRKQLIDNPFWTGFHLLPYVMPL,
 SEQ ID No 52 DPVSLTVALLGGLTMGSLAAGIGTGTAALIETNQFKQLQ,
 20 SEQ ID No 53 SMAKLRERFKQRQKLFESQQGQFEGWYNKSPWETT,
 SEQ ID No 54 AVSLTLAVLLGLGITAGIGGSTALIKGPIDLQQGLTSLQIAIDAD,
 SEQ ID No 55 SMKKLKEKLDKRQLERQDSQNWYEGWFNNWPWFTT,
 SEQ ID No 56 EPVSLTLALLGGLTMGGIAGVGTGTTALVATQQFQQLQAAMHD,
 SEQ ID No 57 SMAKLRERLSQRQKLFESQQGWFEGLFNKSPWFTT,
 25 SEQ ID No 58 EPISLTVALMLGLTVGGIAAGCGTGTKALLEAQFLQLQMOMHTD,
 SEQ ID No 59 NMAKLRERLKQRQQLFDSQQGWFEGLFNKSPWFTT,
 SEQ ID No 60 SPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQQ,
 SEQ ID No 61 PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRET,
 SEQ ID No 62 AVPVAWLVSALAMGAGVAGGITGSMASLASGKSLLHEV,
 30 SEQ ID No 63 PILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAREALQ,
 SEQ ID No 64 AVPIAVWSVSALAAGTGIAGGVGTGSLSLASSKSLLLEVD,
 SEQ ID No 65 SVLQERPPLEKRVITGWGLNWDLGLSQWAREALQ,
 SEQ ID No 66 FPNINENTAYSGENENDCDAELRIWSVQEDDLAAGLSWIPFFGPGI,
 SEQ ID No 67 KNISEQIDQIKKDEQKIGRGWGLGGKWWTSDWG,
 35 SEQ ID No 68 LITGGRRTTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTQDEGAAIGLAWIPYFGPAA,

- SEQ ID No 69 KNITDKIDQIIHDFVDKTLDPQGDNDNWWTGWRQWI,
 SEQ ID No 70 LITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDF,
 SEQ ID No 71 DRLNEVAKNLNESLIDLQELKYEQYKWPWYVW,
 SEQ ID No 72 GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAA,
 5 SEQ ID No 73 HDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWILISFA,
 SEQ ID No 74 FAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSMSSQAIDNLRASLETT,
 SEQ ID No 75 IAKLEDAKELLESSKQILRSMKGLSSTSIVY,
 SEQ ID No 76 FAGIAIGIAALGVATAAQVTAASLVQAQTNARAAAMKNSIQTNRA,
 SEQ ID No 77 TELSKVNASLQNAVQKIKESNHQLQSVSVSSK,
 10 SEQ ID No 78 FFGAVIGTIALGVATAAQITAGIALAEAREARKDIALIKDSIVKTH,
 SEQ ID No 79 TNFLEESKTELMKARAIISVGGWHNTESTQ.
 SEQ ID No 80 LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLS) und
 SEQ ID No 81 NEQELLELDKWASLWNWFDIT NWL
 SEQ ID No 82
- 15 LITQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSSEVVLQNRRLDLLFLKKEGLC
 VALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERLERRRREELDKWASLWNWFN
 SEQ ID No 83
 LITGASVTLTVQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSSEVVLQNRRLDLL
 FLKKEGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERLERRRREELDKWASLWNWFNITNW
 20 LWY
 SEQ ID No 84 LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLS SSPSSNEQELLELDKWASLWNWFDITNW
 SEQ ID No 85
 MGCTSMTLTVQARQLLS DIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ
 QLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNYTSLIHS LIEESQ
 25 NQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNW LWYIK
 SEQ ID No 86 AASVTLTVQARLLLS
 SEQ ID No 87 AAAATLTVQARLLLS
 SEQ ID No 88 AASVAATVQARLLLS
 SEQ ID No 89 AASVTLAAQARLLLS
 30 SEQ ID No 90 AASVTLTVAARLLLS
 SEQ ID No 91 AASVTLTVQAAALLS
 SEQ ID No 92 LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLS
 SEQ ID No 93 NEQELLELDKWASLWNWFDITNW
 SEQ ID No 94 FLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQ
 35 SEQ ID No 95 FLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLL

SEQ ID No 96 FLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHML

SEQ ID No 97 SQNQKEKNEQELLELDKWAGLWSWFSITNWLWY

SEQ ID No 98 SQNQKEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWY

SEQ ID No 99 SQTQKEKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWY

5 Seq ID No 100

LETAQFRQLQMAMHTDIQALEESISALEKSLTSLSEVVLQNRRLDILFLQEGGLCAALKE

ECCFYADHTGLVRDNMAKLRLRERLQRRQLFDSQQGWFEGWFNKSPW

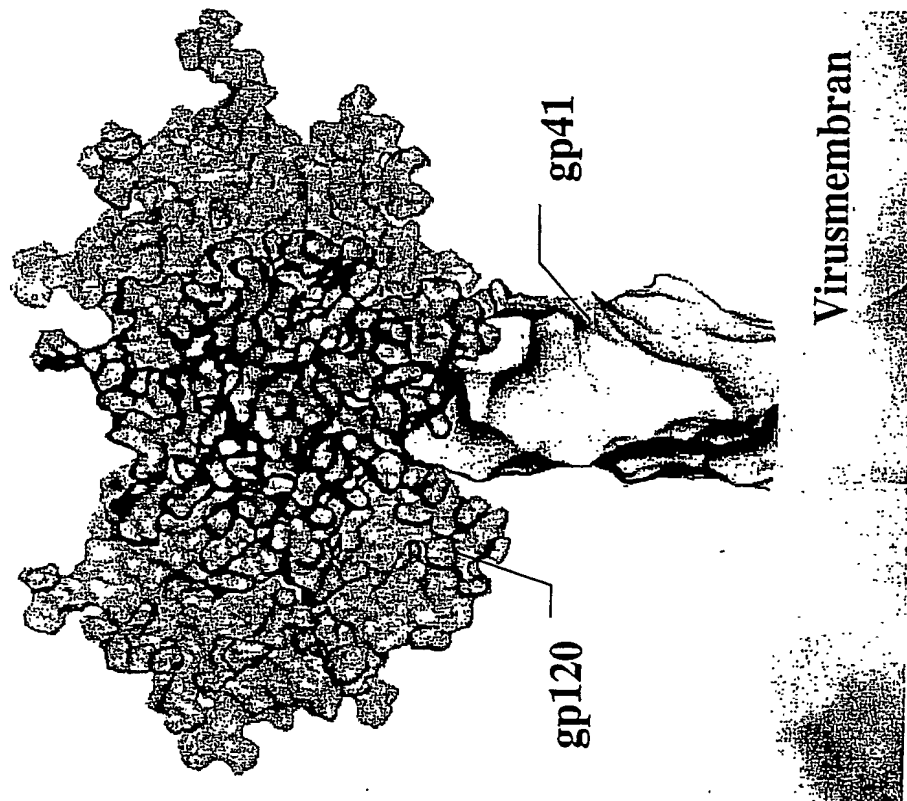
Seq ID No 101 TAALITGPQQLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNL

Seq ID No 102 DHSGAIRDSMSKLRERLERRRREREADQGWFEGWFNR

10 Seq ID No 103 TALIKGPIDLQQGLTSLQIAMDTDLRALQDSISKLED

Seq ID No 104 SMRRLKERLDRQLEHQKNLSWYEGWFNRSPWLTT

Abb.1



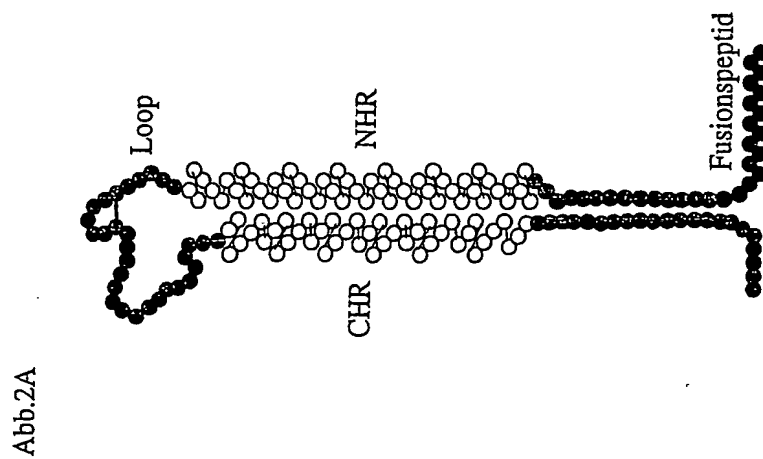


Abb.2B

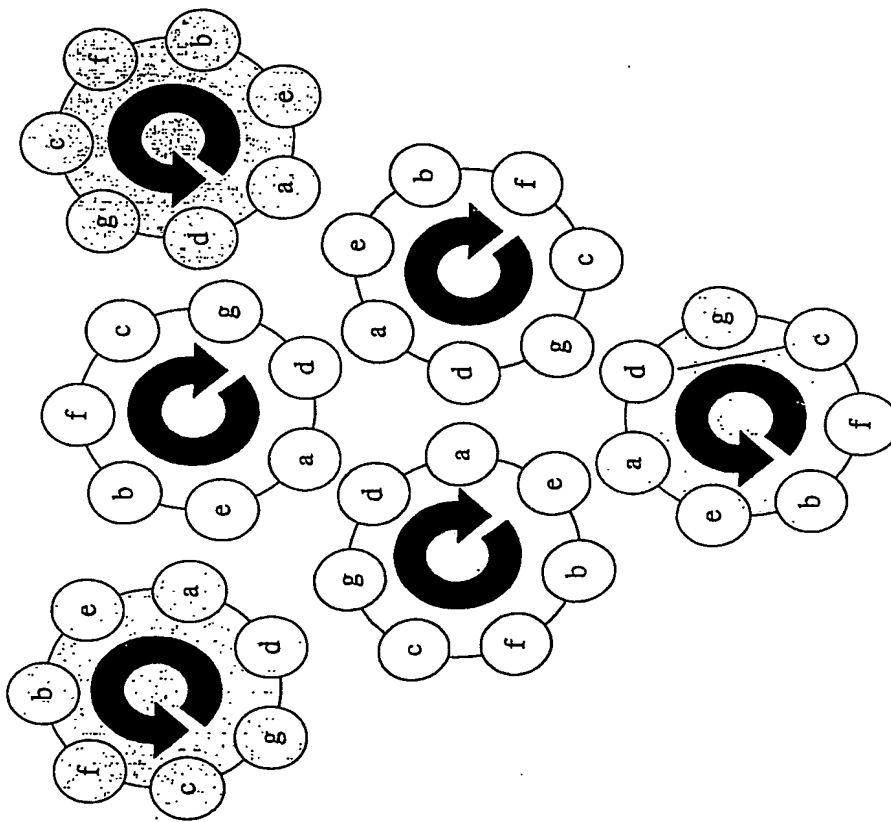


Abb. 2c

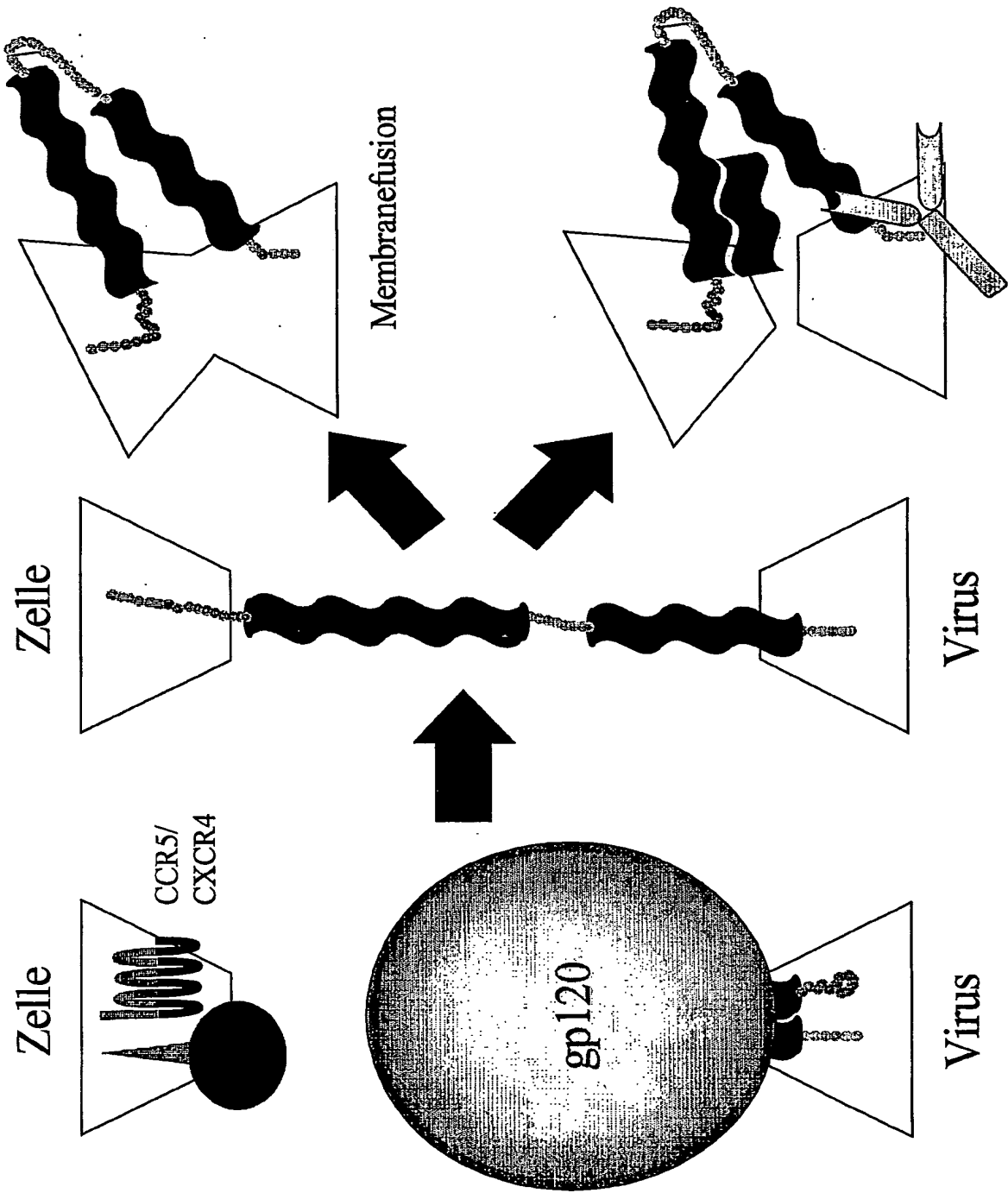


Abb.3

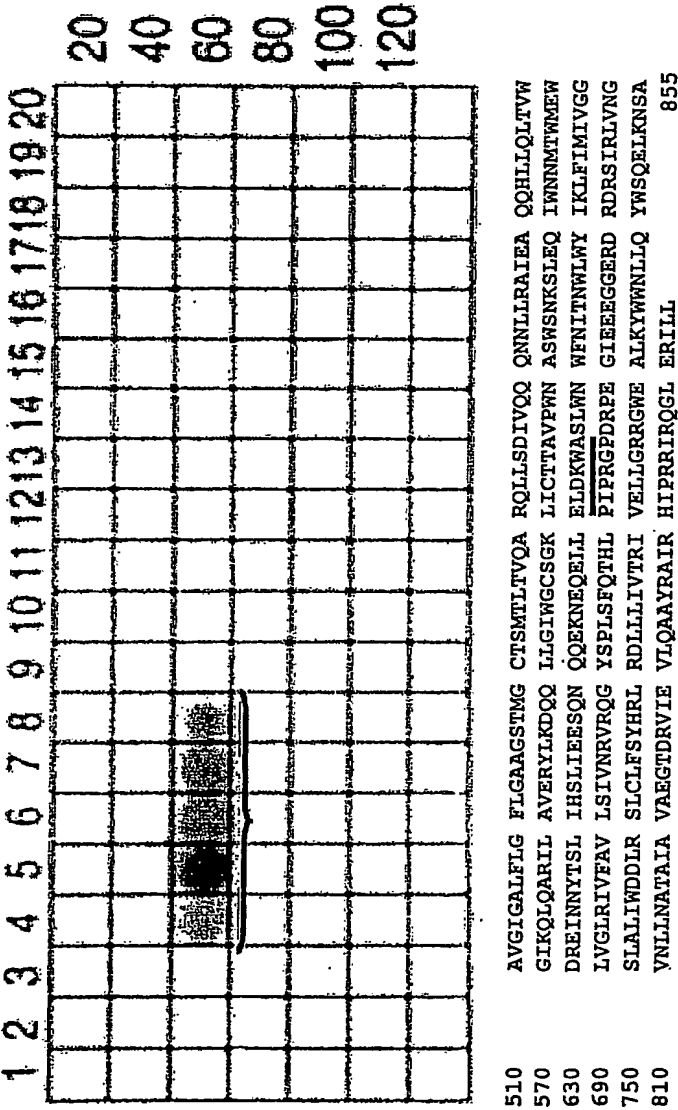
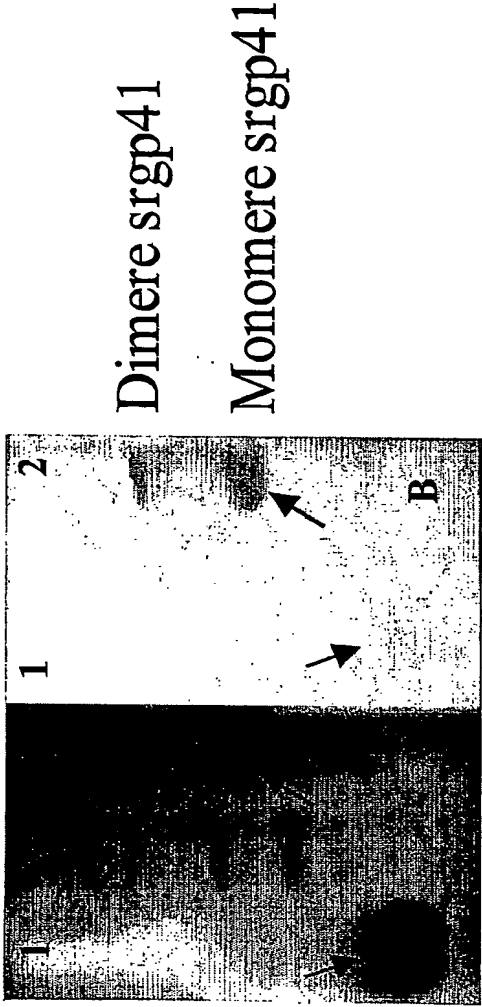


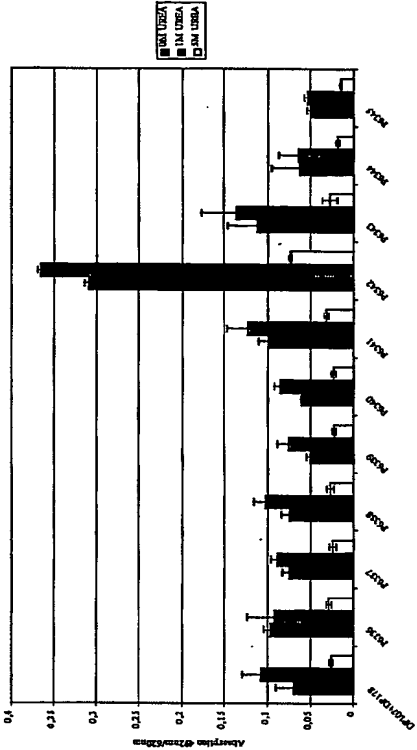
Abb.4



DP178

Abb.5

A



B

NIH-Peptide	
6336	QREKRAAI GALFLGF
6337	RAAI GALFLGELGAA
6338	GALFLGELGAA
6339	LGFLGAAGSTMGAA
6340	GAAGSTMGAA
6341	STMGAA
6342	AASVILTVQAR
6343	TLTVQARLLSGI VO
6344	QARLLSGI VOQNN
6345	LLSGI VOQNNLLRA
DP107	NNLLRAI EAQQLQLTVNGI KQLQARI LAVERYKQDQ

Abb.6

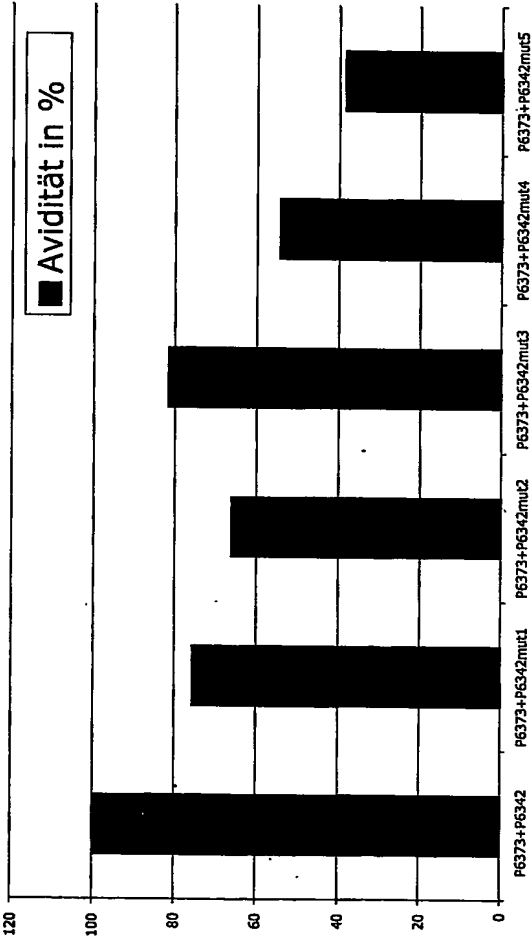


Abb.7

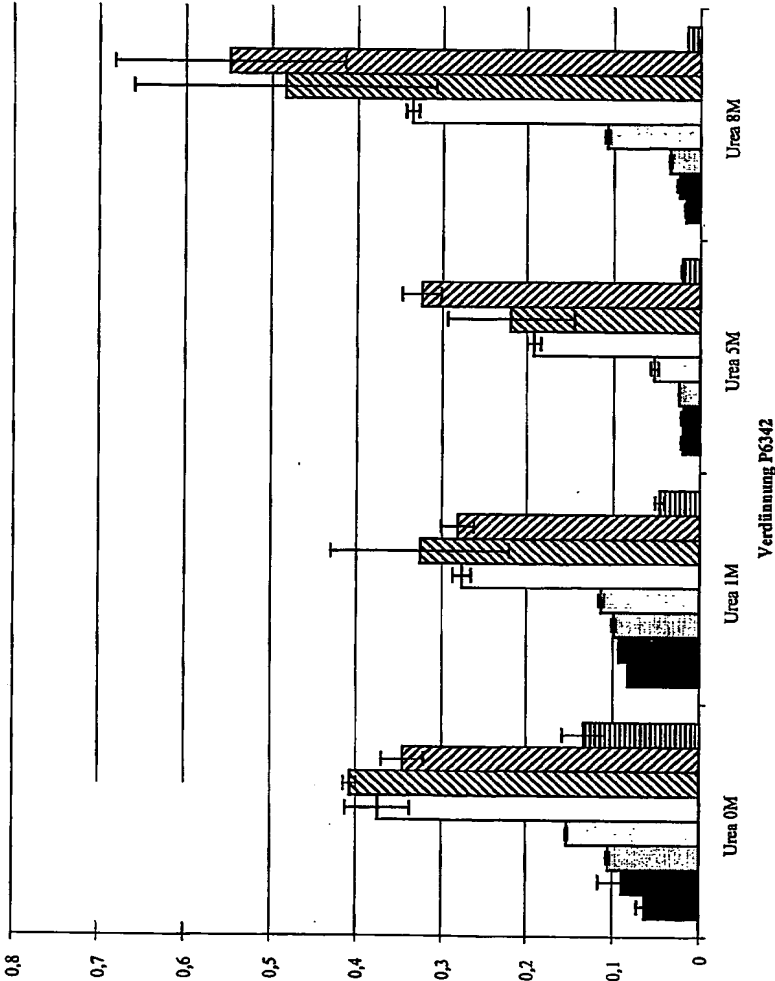


Abb.8

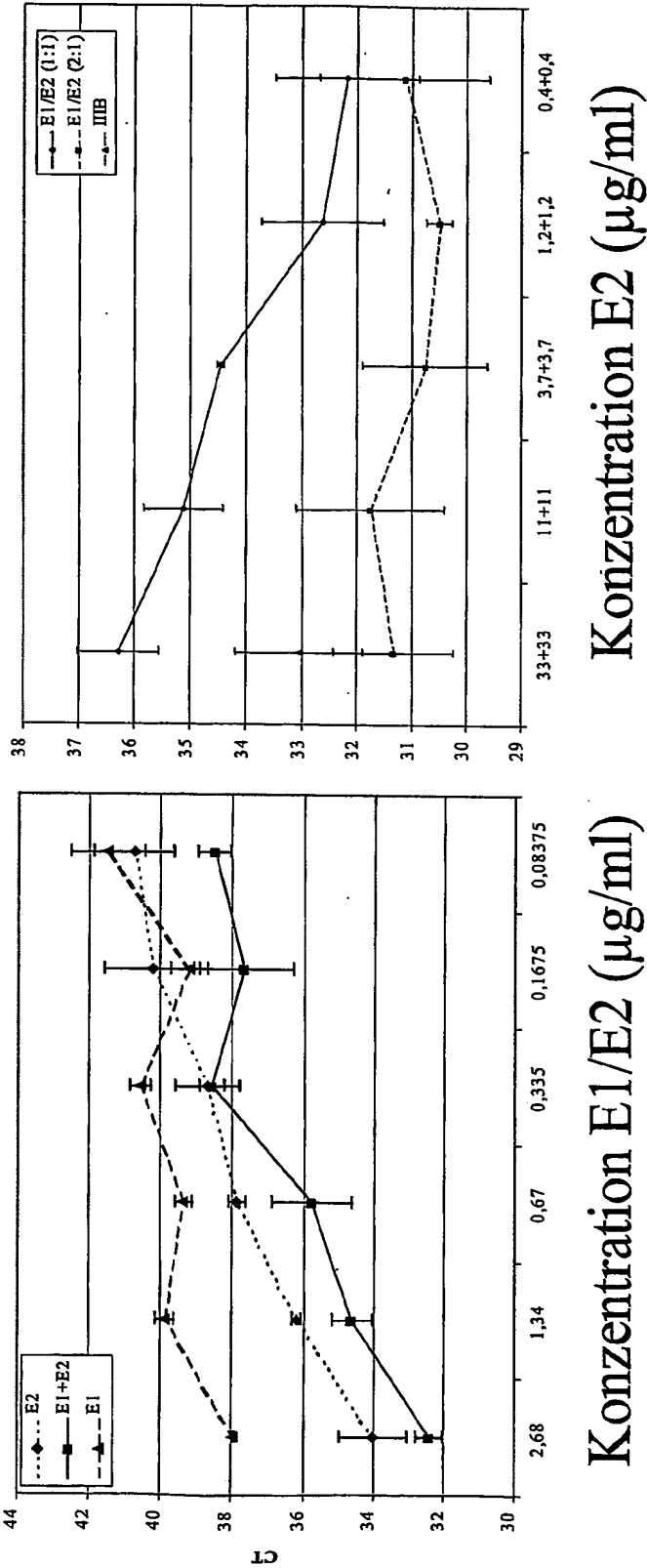


Abb.9

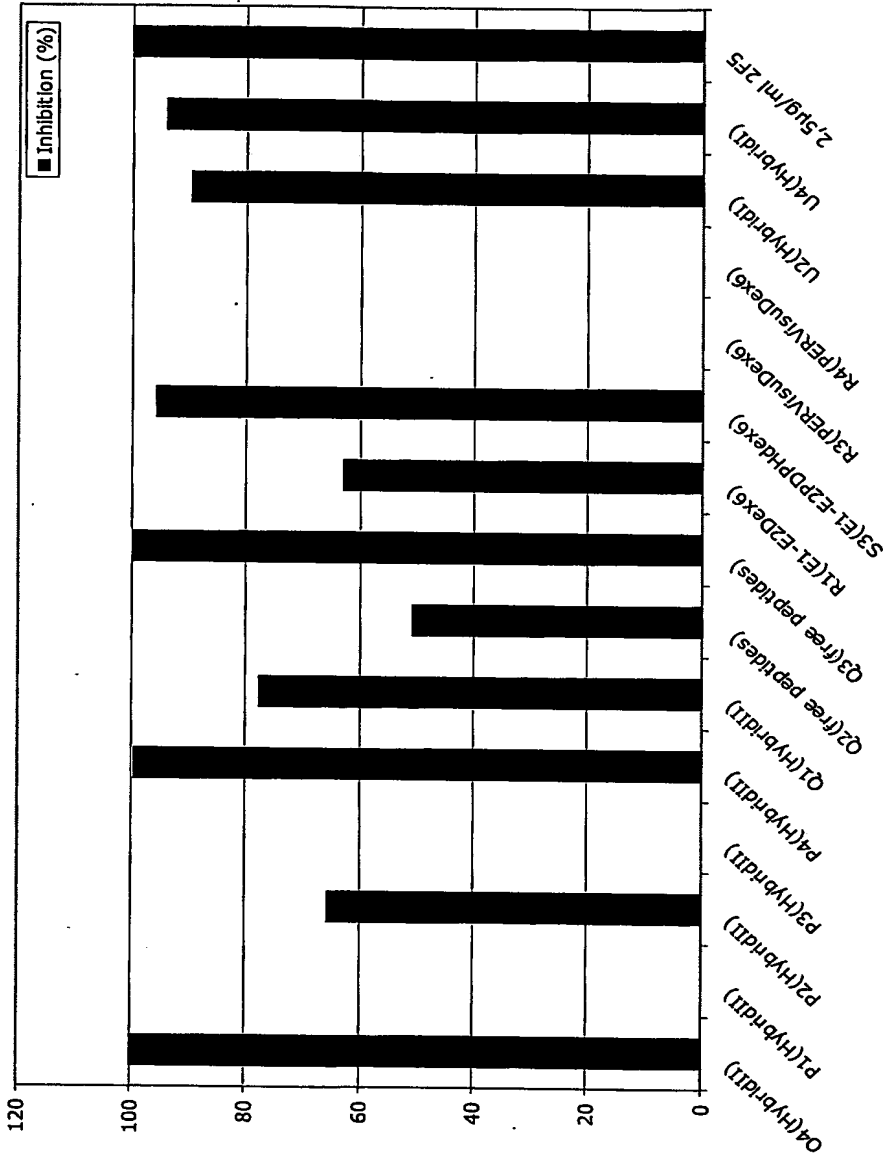
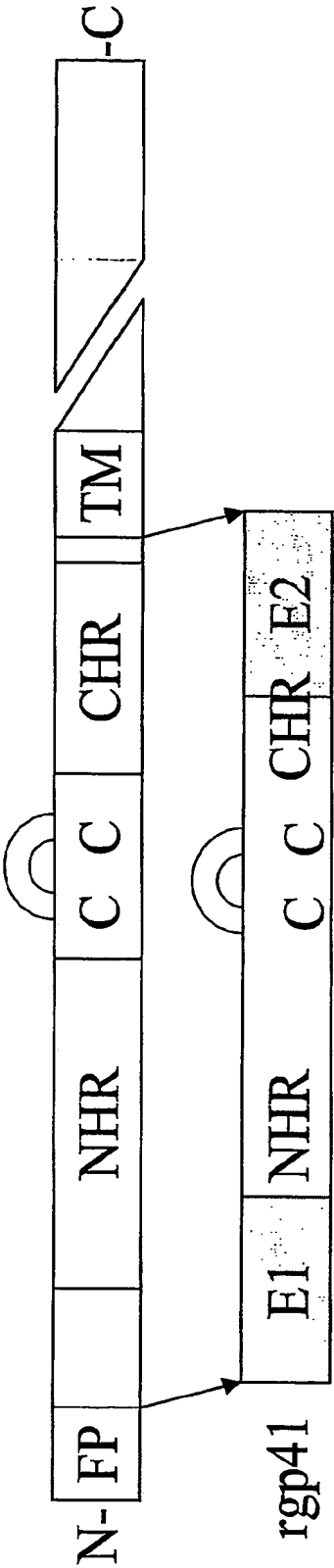


Abb. 10

A: von gp41 abgeleitete rekombinante Proteine



B: von p15E/gp41 abgeleitete rekombinante Proteine

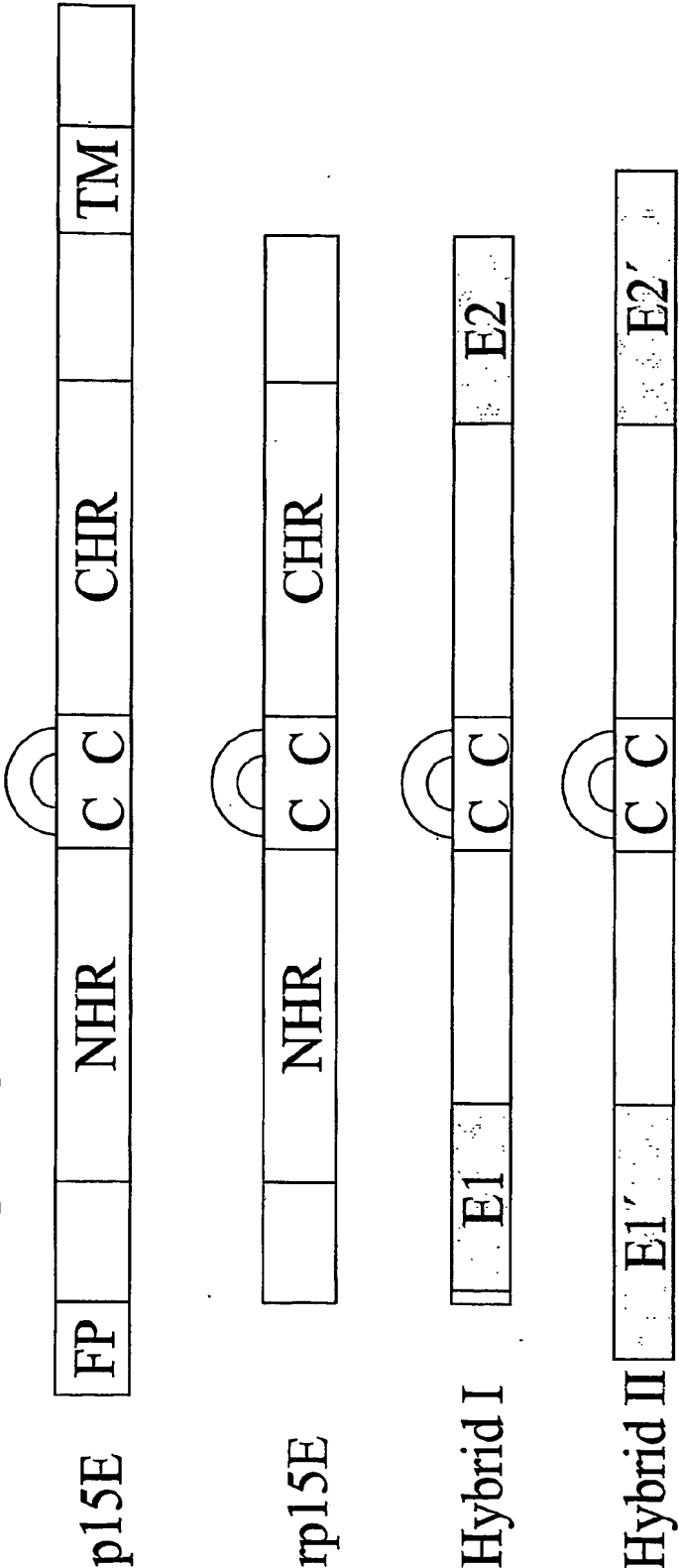
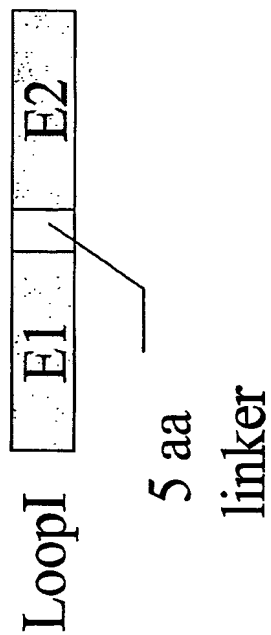


Abb. 11

A: Rekombinantes Loop-Protein



B: Freie Peptide und Peptide nach Cross-linking an 6kDa Dextran

mittels PDPH

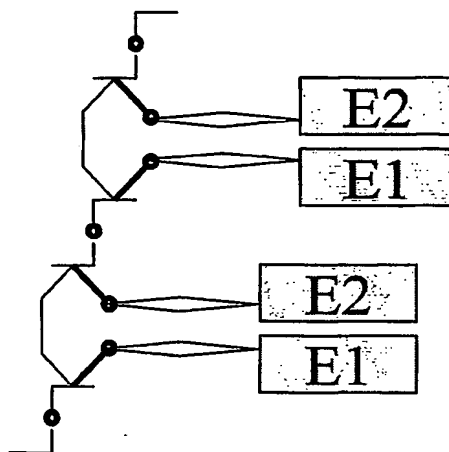
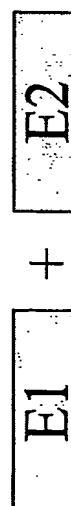


Abb.12

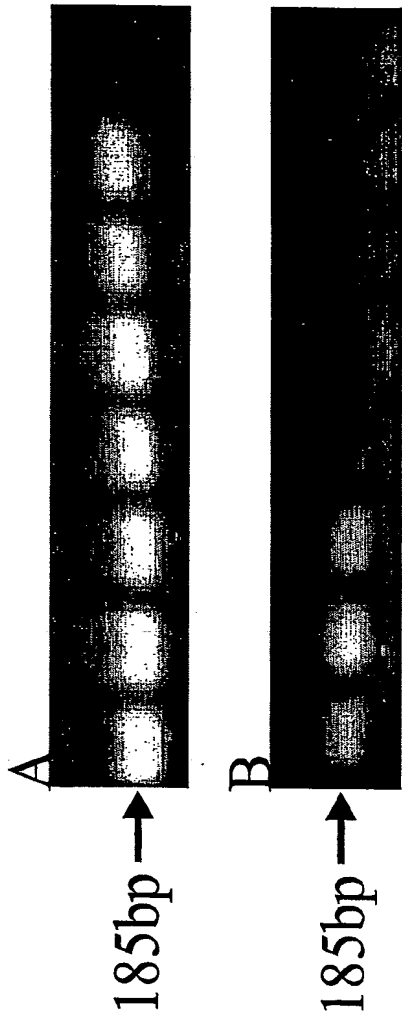
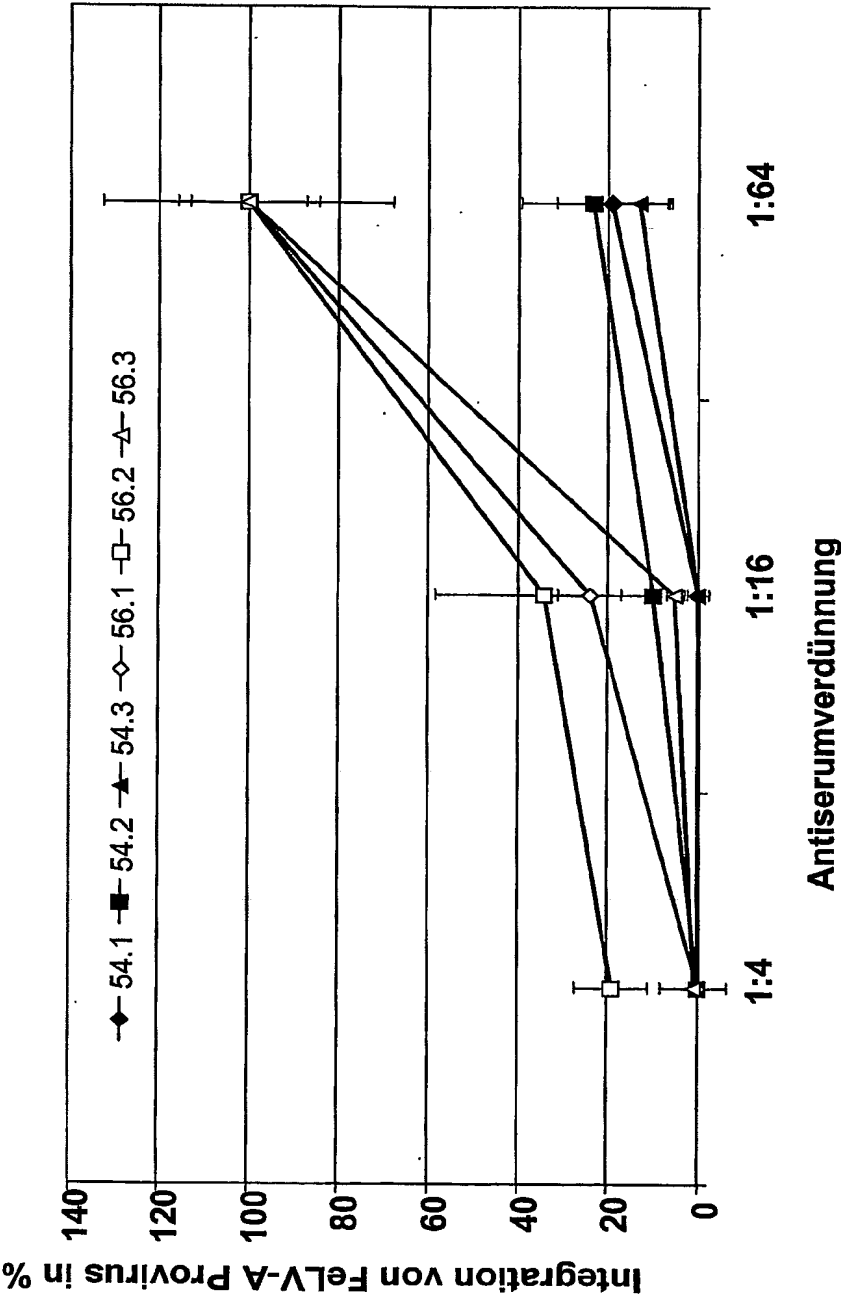


Abb. 14 Neutralisierende Eigenschaften von Rattenserum nach Immunisierung mit Leucogen entweder mit dem rekombinanten p15E von FeLV(Gruppe 54) oder ohne diese Protein (Gruppe 56)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.